**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Mapeamento de locos de resistência quantitativa da soja ao complexo
de percevejos**

Milene Möller

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2010**

**Milene Möller
Bióloga**

**Mapeamento de locos de resistência quantitativa da soja ao complexo de
percevejos**

**Orientador:
Prof. Dr. JOSÉ BALDIN PINHEIRO**

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Möller, Milene

Mapeamento de locos de resistência quantitativa da soja ao complexo de percevejos / Milene Möller. - - Piracicaba, 2010.

86 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

Bibliografia.

1. Genética molecular vegetal 2. Mapeamento genético 3. Marcador molecular 4. Percevejo
5. Soja I. Título

CDD 633.34
M726m

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

*Ao Bruno,
pelo amor, apoio, compreensão
e ajuda fundamental no trabalho.*

*Aos meus pais,
pelo amor incondicional e
por tudo que tenho e sou.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir superar os obstáculos e concluir este trabalho;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela excelente qualidade de ensino;

Ao Departamento de Genética da ESALQ pela oportunidade em realizar o curso de mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas;

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos;

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Baldin Pinheiro, pela oportunidade, confiança e amizade. Pelo seu otimismo e boa vontade, sempre me incentivando à pesquisa e ainda pelo exemplo de pesquisador;

À Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi pela co-orientação, amizade, ensinamentos e por toda a ajuda fundamental no trabalho;

A todos os colegas de trabalho do Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento, em especial à Michelle pela ajuda fundamental, à Keila, ao Pedro e ao Miklos pela colaboração, à Mariza por toda a ajuda e conhecimento e ao Bruno pela ajuda prática e revisão do texto.

Aos funcionários do Departamento de Genética, em especial ao Domingos de Sálvio Amaral, Márcio Araújo Silva, Ronaldo José Rabello, Cláudio Roberto Segatelli e José Monteiro pela competência e compromisso com o trabalho;

À Dra. Luciana Rossini Pinto, Dra. Luciana Aparecida Carlini-Garcia, ao Prof. Dr. Antonio Augusto Franco Garcia e ao Me. Marcelo Mollinari pela disponibilidade e prontidão em me ajudar;

Ao Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho pela disponibilidade e valiosas contribuições nas análises;

Ao meu querido Bruno pelo seu caráter, companheirismo, inteligência e simplesmente por fazer parte da minha vida e me fazer muito feliz;

Ao meus pais, Gilson e Márcia, por toda a sabedoria e princípios ensinados, por sempre me apoiarem nas minhas decisões e por me auxiliarem e permitirem chegar onde estou;

Ao meu irmão Rodrigo e minha cunhada Bianca por todo o apoio e por me presentear com a minha querida sobrinha Clara;

À minha querida avó Ivone, ao meu avô Alvino e à “tia” Marcelina pelo carinho;

Aos meus queridos tios, tias, primos e primas por todo o incentivo e pela compreensão da minha ausência aos finais de semana;

À minha bisavó Segunda (*in memorian*), ao meu avô Aristides (*in memorian*) e à minha avó Guilhermina Nair (*in memorian*) que estarão sempre no meu coração;

À Nilce e ao Luiz pelo apoio e carinho;

À minha querida amiga e ex-professora Luciane por todos os ensinamentos e conhecimentos transmitidos, e que mesmo de longe sempre me acompanha;

Ao querido casal Ana Luiza e Fábio pela valiosa amizade;

Aos amigos Kelly e Koió pelos momentos compartilhados;

A todos que de alguma forma ajudaram na realização desse trabalho, mesmo que aqui não mencionados.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 IMPORTÂNCIA DA SOJA	15
2.2 COMPLEXO DE PERCEVEJOS DA SOJA	16
2.3 TIPOS DE RESISTÊNCIA	18
2.4 MAPEAMENTO DE QTLs	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 CRUZAMENTO DOS GENITORES PARA OBTENÇÃO DA GERAÇÃO F_1	25
3.2 OBTENÇÃO DA GERAÇÃO F_2	26
3.3 CONDUÇÃO DA GERAÇÃO F_2	26
3.4 FENOTIPAGEM DA GERAÇÃO F_2	28
3.5 EXTRAÇÃO DE DNA	32
3.6 GENOTIPAGEM DA GERAÇÃO F_2	32
3.6.1 MARCADORES AFLP.....	32
3.6.2 BUSCA DE GENES EM BANCO DE DADOS	34
3.6.3 DESENHO DE PRIMERS COMPLEMENTARES AOS GENES ALVO	35
3.6.4 MARCADORES TRAP	35
3.6.5 MARCADORES SNP	37
3.6.6 COMPARAÇÃO DOS MARCADORES AFLP E TRAP	39
3.7 CONSTRUÇÃO DO MAPA GENÉTICO	39
3.8 MAPEAMENTO DE QTLs	41
3.8.1 MAPEAMENTO POR MARCAS SIMPLES.....	41
3.8.2 MAPEAMENTO POR INTERVALO COMPOSTO	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DO EXPERIMENTO DE CAMPO.....	43
4.2 FLUTUAÇÃO POPULACIONAL DE PERCEVEJOS	45

4.3 GENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO F_2	46
4.3.1 MARCADORES AFLP	46
4.3.2 MARCADORES TRAP	48
4.3.3 MARCADORES SNP	49
4.3.4 COMPARAÇÃO DOS MARCADORES AFLP E TRAP	50
4.4 CONSTRUÇÃO DO MAPA GENÉTICO.....	51
4.5 MAPEAMENTO DE QTLs.....	54
4.5.1 MAPEAMENTO POR MARCAS SIMPLES	54
4.5.2 MAPEAMENTO POR INTERVALO COMPOSTO	60
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
6 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS.....	83

RESUMO

Mapeamento de locos de resistência quantitativa da soja ao complexo de percevejos

O cultivo da soja em grandes áreas agrícolas e o plantio sucessivo em uma mesma área contribuíram significativamente para o aumento na incidência de insetos-praga nessa cultura, causando danos crescentes à produção. Os percevejos sugadores de sementes são considerados uma das pragas de maior importância para a cultura da soja. Neste estudo, 286 plantas F_2 provenientes do cruzamento entre IAC-100 e CD-215 foram utilizadas para a identificação de marcadores ligados a genes de resistência a estes insetos. O delineamento inteiramente casualizado foi adotado sendo avaliados dez caracteres agrônômicos e cinco caracteres relacionados à resistência a insetos. Um mapa genético foi construído com base em marcadores AFLP e TRAP. A partir de 14 combinações AFLP utilizadas um total de 643 marcas foi obtido, das quais 67 (10,42%) foram polimórficas, com média de 4,79 marcas polimórficas por combinação. Para o marcador TRAP, 11 combinações de *primers* fixo/arbitrário geraram 230 marcas, sendo 31 (13,48%) polimórficas, média de 2,82 marcas polimórficas por combinação. Apesar do menor número de marcas polimórficas por combinação, a percentagem de polimorfismo obtida com o marcador TRAP (0,13) foi maior do que para o AFLP (0,10). Foram observados valores moderados para o PIC, com média de 0,37 para ambos os marcadores. Os marcadores SNP apresentaram polimorfismo não informativo, não sendo utilizados no mapeamento. No mapa de ligação foram posicionados 49 marcadores (35 AFLP e 14 TRAP), distribuídos por 12 grupos de ligação, totalizando 696 cM com distância média de 17,93 cM entre marcadores. Para a identificação de QTLs foram utilizadas duas abordagens. A análise de marcas simples permitiu a detecção de três e seis QTLs ($LOD=2,5$), considerando os valores significativos a 5% e 10%, respectivamente. Pelo método de mapeamento por intervalo composto foram identificados 14 QTLs, referentes a cinco caracteres, distribuídos por oito grupos de ligação. A proporção da variação fenotípica explicada por estes QTLs variou de 8,94% a 59,97%.

Palavras-chave: Genética molecular vegetal; Mapeamento genético; Marcador molecular; Percevejo; Soja

ABSTRACT

Mapping of quantitative resistance loci from soybean to stink bug complex

Cultivation soybean in major agricultural areas and successive planting in the same area significantly contribute to the increase in the incidence of insect pests on this crop, causing increasing damage to production. The seed-sucking stink bugs are considered to be one of the major pests of soybeans. In this study, 286 F₂ plants obtained from crosses of IAC-100 and CD-215 were used to identify markers linked to resistance genes to these insects. The completely randomized design was adopted and ten agronomic traits and five traits related to insect resistance were analyzed. A genetic map was constructed based on AFLP and TRAP markers. From 14 AFLP combinations used a total of 643 marks were obtained, of which 67 (10.42%) were polymorphic, with an average of 4.79 polymorphic marks per combination. For the TRAP marker, 11 primers combinations fixed/arbitrary generated 230 marks, of which 31 (13.48%) were polymorphic, an average of 2.82 polymorphic marks per combination. Despite the lower number of polymorphic marks per combination, the percentage of polymorphism obtained with the TRAP marker (0.13) was higher than that for AFLP (0.10). Intermediate PIC values were found, with an average of 0.37 for both markers. The SNP markers presented not informative polymorphisms and were not used in the mapping. The linkage map consisted of 49 markers (35 AFLP and 14 TRAP), scattered across 12 linkage groups, totalizing 696 cM with an average distance of 17.93 cM between markers. QTLs mapping was conducted using two distinct approaches. The single marker analysis allowed the identification of three and six QTLs (LOD=2.5), considering the significance level at 5% and 10%, respectively. The composite interval mapping approach allowed the identification of 14 QTLs, concerning five characters, scattered across eight linkage groups. The proportion of the phenotypic variation explained by these QTLs ranged from 8.94% to 59.97%.

Keywords: Plant molecular genetics; Genetic mapping; Molecular marker; Stink bug; Soybean

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L) Merr.] ($2n= 40$ cromossomos) é uma planta autógama, cuja composição taxonômica se insere na divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, sub-classe Rosidae, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae, gênero *Glycine* (NCBI, 2010). O centro de origem desta planta localiza-se no leste da Ásia, sendo o centro-sul da China o centro primário, e a região da Manchúria, onde a soja foi domesticada, o centro secundário (XU et al., 1989).

Quando cultivada, a soja está sujeita ao ataque de insetos-praga desde a germinação até a colheita. Em termos gerais, na fase vegetativa a principal praga é a lagarta desfolhadora *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) e na fase reprodutiva os percevejos, especialmente os da família Pentatomidae. No Brasil, os percevejos mais abundantes nesta leguminosa são: *Nezara viridula* (L.), *Piezodorus guildinii* (West.) e *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). As populações destes pentatomídeos estão presentes em frequência e abundância variáveis de região para região e de ano para ano, com predominância de uma ou outra espécie, dependendo das condições climáticas e da cultivar semeada (CIVIDANES; PARRA, 1994; MAGRINI et al. 1996).

Por se alimentarem diretamente dos grãos, os percevejos são responsáveis por perdas significativas de rendimento, qualidade e potencial germinativo da semente, além de dificultarem a colheita mecânica (PANIZZI; SLANSKY JÚNIOR, 1985). Visando o controle desta praga, o aumento na utilização de inseticidas tem sido frequente, ocasionando danos ambientais e elevando o custo de produção da cultura. Além disso, a utilização indiscriminada de inseticidas em determinadas culturas tem contribuído para a seleção de populações de insetos resistentes a inseticidas.

O investimento na característica de resistência genética a insetos deve ser valorizado, haja vista um aumento na incidência de insetos-praga na cultura da soja, devido, provavelmente, ao cultivo sucessivo e ao aumento da área cultivada (MOURA, 1999). Também tem se verificado que o processo de melhoramento genético dirigido para a produtividade de grãos e para a qualidade das plantas ou de seus derivados pode torná-las mais vulneráveis a insetos-praga (PANIZZI et al. 1986; LUSTOSA et al. 1999). Além disso, a obtenção de cultivares resistentes culminaria na redução da

utilização de inseticidas, o que traria benefícios econômicos em virtude da diminuição do custo de produção, benefícios ecológicos, por reduzir o nível de agressão ao meio ambiente, e benefícios sociais, por permitir que a cultura seja praticada por agricultores com menor disponibilidade de capital e de equipamentos para aplicação de defensivos (VENTURA; PINHEIRO, 1999).

A maior parte dos caracteres de importância econômica e agrônômica estudados em diversas espécies vegetais é de natureza quantitativa. Os genes ou locos cromossômicos que controlam uma determinada característica quantitativa são denominados QTLs (*Quantitative Trait Loci*). Estudos utilizando marcadores moleculares são fundamentais na identificação dos QTLs envolvidos na resistência da soja ao complexo de percevejos, sendo uma ferramenta útil aos métodos tradicionais de melhoramento. A utilização destes marcadores na seleção assistida aumenta a eficiência de avaliação, reduz o intervalo das gerações e direciona os cruzamentos, além de facilitar a transferência de alelos de resistência minimizando os arrastes de genes indesejáveis (WELLER; FERNANDO, 1991).

A obtenção de um mapa genético da soja envolvendo a característica de resistência a percevejos contribuirá para gerar conhecimento e tecnologias que possibilitarão o aumento da sustentabilidade do cultivo da espécie. Isto minimizará os riscos de perda para o sojicultor, disponibilizará informações para a diminuição do uso de agrotóxicos na cultura, culminando na redução dos custos de produção. Permitirá ainda um avanço no sistema de produção de soja orgânica, além de um menor risco de contaminação ambiental e problemas toxicológicos ao agricultor. Este trabalho objetivou mapear QTLs em soja associados à resistência ao complexo de percevejos. Para tanto, foram utilizados três tipos diferentes de marcadores moleculares: AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). O primeiro contribuiu para saturar o mapa genético, enquanto que os dois últimos são marcadores funcionais e foram utilizados para avaliar o polimorfismo de genes de interesse.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância da Soja

A soja (*Glycine max*) é uma das culturas mais importantes do mundo, sendo usualmente comercializada em grão, farelo e óleo bruto e refinado, constituindo grande fonte de proteína para toda a humanidade, além de apresentar grande potencial na fabricação de plásticos e biodiesel. A utilização de derivados da soja na substituição de substâncias químicas nocivas, como na indústria de materiais de limpeza e tintas, tem aumentado pelo fato da soja ser renovável, abundante e biodegradável, ao contrário dos produtos derivados do petróleo normalmente usados. No mundo todo o agronegócio da soja movimenta aproximadamente 230 bilhões de dólares. O Brasil é o segundo maior produtor de soja, com uma área cultivada de mais de 21,7 milhões de hectares e 57,1 milhões de toneladas de produção (CONAB, 2009). O maior produtor mundial são os Estados Unidos, que com uma área cultivada de 30 milhões de hectares e 80 milhões de toneladas produzidas por ano, são responsáveis por 38% de toda a produção mundial (FAO, 2009). No Brasil, o complexo agroindustrial da soja movimenta cerca de 30 bilhões de dólares por ano e tem grande peso na balança comercial, contribuindo com 26% das exportações do agronegócio e 11% das exportações totais do país (SECEX, 2009).

A cultura da soja, inicialmente cultivada apenas na Região Sul do Brasil, expandiu-se para o Cerrado e mais recentemente para a Região Norte e Nordeste do País. O uso de alta tecnologia de produção contribuiu para essa expansão da indústria da soja no país. Uma das consequências das grandes áreas cultivadas com soja está relacionada ao aumento de pragas que atacam essa oleaginosa, causando danos crescentes à produção (MOURA, 1999). Além disso, o processo de melhoramento genético visando à produtividade de grãos e à qualidade das plantas ou de seus derivados pode torná-las ainda mais vulneráveis a insetos-praga (PANIZZl et al., 1986; LUSTOSA et al., 1999). Nas diversas regiões produtoras do país, os percevejos sugadores das vagens, juntamente com as lagartas desfolhadoras, constituem os dois principais grupos de pragas que normalmente causam prejuízos econômicos às lavouras (VENZON et al., 1999).

2.2 Complexo de percevejos da soja

Os percevejos sugadores de sementes são considerados, em vários países, como uma das pragas de maior importância para a cultura da soja (PANIZZI; SLANSKY JÚNIOR, 1985; CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999; PANIZZI et al., 2000). As espécies *Euschistus heros* (F.), *Piezodorus guildinii* (West.) e *Nezara viridula* (L.), conhecidas, respectivamente, como percevejo-marrom, percevejo pequeno e percevejo-verde, constituem o “complexo de percevejos” da soja. Estas espécies são as mais abundantes no Brasil (CORRÊA-FERREIRA; PERES, 2003), embora várias outras da família Pentatomidae também possam estar presentes em menor frequência (CIVIDANES; PARRA, 1994). Independente da espécie predominante, os danos ocasionados às sementes por insetos sugadores são semelhantes e irreversíveis (GAZZONI; MOSCARDI, 1998; BERLOTTE et al., 2003).

Os danos à soja são causados principalmente por ninfas maiores, de 3º a 5º instares e por adultos. A introdução do aparelho bucal, em forma de estilete, nos ramos e, principalmente, nas sementes, pode impedir a planta de completar seu ciclo, retardar a maturação fisiológica, causar retenção foliar e dificultar a colheita mecânica (GAZZONI; MOSCARDI, 1998). Como consequência, pode ocorrer perda significativa no rendimento, na qualidade e no potencial germinativo das sementes (PANIZZI; SLANSKY JÚNIOR, 1985; VILLAS-BÔAS et al., 1990; BRIER; ROGERS, 1991; PANIZZI et al., 2000; CORRÊA-FERREIRA; AZEVEDO, 2002). Os percevejos são também responsáveis pela transmissão de patógenos, como a levedura *Nematospora coryli*, e podem causar reduções no teor de óleo e aumento na percentagem de proteínas e ácidos graxos livres nas sementes (PANIZZI et al., 1979; VILLAS-BÔAS et al., 1990; SOSA-GÓMEZ; MOSCARDI, 1995; BOETHEL et al., 2000).

Embora a infestação das plantas de soja pelos percevejos se inicie no final do período vegetativo ou durante a floração, é no período do desenvolvimento de vagens, ao final do enchimento de grãos, que esses insetos aumentam seus níveis populacionais e causam os maiores prejuízos à cultura (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999). De acordo com dados fornecidos pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) e CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) a perda de produção na cultura da soja por causa do ataque de insetos, no Brasil, foi de 5% no fim

da década de 90, representando quase US\$3 milhões de dólares ao ano. O crescimento populacional é decorrente da intensa migração de insetos adultos provenientes de lavouras recém-colhidas, em busca de melhores condições de abrigo, alimentação e reprodução (GAZZONI, 1998).

A resistência a insetos em soja tem sido objetivo de alguns programas de melhoramento, mas a obtenção de cultivares agronomicamente competitivas e resistentes ao complexo de percevejos não tem apresentado sucesso pelo fato da resistência aos percevejos apresentar controle poligênico, com predominância de efeitos aditivos (SOUZA; TOLEDO, 1995; GODOI; PINHEIRO, 2009). Contudo, o controle genético para as diferentes espécies de percevejos é o mesmo, ou seja, selecionando-se genótipos resistentes para uma espécie, a resistência para o complexo de percevejos seria assegurada (PINHEIRO, 1993). Além disso, tem sido relatado que características agronômicas não desejáveis encontram-se fortemente ligadas aos QTLs que conferem resistência a insetos, resultando em um arraste de genes indesejáveis associados aos genes de interesse (*linkage drag*) (BOETHEL, 1999).

Atualmente, no Brasil, há poucas cultivares resistentes a insetos recomendadas para cultivo. Entre estas se encontram IAC-100 e IAC-17 (ROSSETTO, 1989; PINHEIRO, 1993; VEIGA et al., 1999), além de IAC-23 e IAC-24 (MIRANDA et al., 2001; MIRANDA; LOURENÇÃO, 2002), sendo adaptadas somente à região Sudeste. A cultivar IAC-100 possui em sua genealogia as PIs (*Plant Introductions*) 229358 e 274454, consideradas fontes de resistência ao complexo de percevejos, e tem sido utilizada em várias pesquisas como um genótipo padrão de resistência aos insetos desfolhadores e sugadores (ANEXO A). Em um estudo de diversidade em germoplasma de soja utilizando marcadores microssatélites, Mulato (2009) e Mulato et al. (2010) observaram que a PI 229358 apresentou quantidade significativa de alelos exclusivos sendo ainda uma das mais divergentes em um grupo de 79 PIs analisadas. Com isso, a exploração da cultivar IAC-100 como germoplasma fonte de resistência múltipla aos insetos-praga tem sido comum, pois, além dessa característica, este genótipo apresenta características agronômicas favoráveis e boa produtividade de grãos (PINHEIRO et al., 2005). Esta cultivar foi avaliada em trabalhos realizados nos Estados Unidos por McPherson & Buss (2007) e McPherson, Buzz & Roberts (2007),

confirmando o seu grande potencial como fonte de resistência para percevejos sugadores e insetos desfolhadores.

2.3 Tipos de resistência

Durante muito tempo, o melhoramento vegetal foi utilizado somente com o objetivo de aumentar a produção, em detrimento de características de resistência a pragas, sendo os produtos gerados altamente dependentes de insumos agropecuários. Entretanto, muitas famílias de plantas apresentam mecanismos de resistência a insetos (PAINTER, 1951; KOGAN; ORTMAN, 1978), sendo uma das principais estratégias utilizadas no manejo integrado de pragas. Existem várias definições para resistência de plantas a insetos. De acordo com Painter (1951), consiste na soma relativa das qualidades hereditárias da planta, a qual influencia no resultado do grau de dano que o inseto causa. A resistência das plantas aos insetos pode ser classificada em três categorias, estando todas presentes na soja. A antixenose é caracterizada pela menor utilização do hospedeiro pelo inseto tanto para alimentação, oviposição ou abrigo. O efeito é manifestado no comportamento do inseto, repercutindo principalmente na redução da atratividade e aceitação do substrato e, conseqüentemente diminuindo o número de ovos e a área consumida. A antibiose caracteriza-se pelos efeitos deletérios da planta sobre o inseto, provocando principalmente alterações no seu desenvolvimento. Os principais efeitos da antibiose são: mortalidade das formas jovens e na transformação para adulto, redução do tamanho, peso e fecundidade dos indivíduos, alteração da proporção sexual e no tempo de vida. Já a tolerância refere-se à capacidade da planta de suportar uma quantidade moderada de dano sem apresentar perdas significativas no seu rendimento. Pelo fato de a tolerância não afetar o comportamento ou biologia do inseto, propicia, a longo prazo, aumento na população da praga, podendo resultar em dano econômico à plantação. Entretanto, tal efeito pode ser contornado desde que se utilizem táticas complementares de manejo integrado de pragas.

A independência genética dos mecanismos de antixenose e antibiose tem sido sugerida, embora os seus efeitos possam ser confundidos (PAINTER, 1951; RECTOR et al., 1999; RECTOR et al., 2000). Dependendo do método de fenotipagem utilizado o

melhorista geralmente seleciona genótipos apenas para um desses dois tipos de resistência, resultando na perda dos alelos do outro tipo.

2.4 Mapeamento de QTLs

A maior parte dos caracteres de importância econômica e agrônômica estudados em diversas espécies vegetais é de natureza quantitativa. Caracteres quantitativos possuem expressão complexa, cujo controle genético é efetuado por dois ou mais genes, cada um possuindo pequeno efeito sobre o fenótipo, o qual apresenta grande influência ambiental (THODAY, 1961; GELDERMANN, 1975). Os fenótipos resultantes apresentam uma variação contínua na população ao invés de classes discretas. Portanto, por definição, QTLs são regiões cromossômicas relacionadas com a variação fenotípica das características quantitativas.

O mapeamento de regiões genômicas associadas à herança de características quantitativas se constitui em uma aplicação importante dos mapas genéticos construídos com base em marcadores moleculares. A detecção e mapeamento de QTLs somente é possível pela análise conjunta de genótipos marcadores e valores fenotípicos dos indivíduos. De modo análogo às metodologias clássicas de mapeamento genético, o princípio básico que fundamenta as análises de mapeamento de QTL é a existência de desequilíbrio gamético de ligação decorrente da redução da frequência de recombinação entre genes situados em regiões próximas entre si ao longo de determinado cromossomo (COELHO, 2000). Sem esse pré-requisito, os alelos dos locos marcadores e dos QTLs ocorrerão em combinações equivalentes à distribuição independente, fazendo com que os QTLs não sejam detectados. Este desequilíbrio gera efeitos quantitativos associados ao marcador, os quais podem ser detectados e estimados por meio de análises estatísticas adequadas. Na última década diversos resultados foram publicados com a identificação de QTLs associados à resistência da soja a insetos desfolhadores (RECTOR et al., 1998; RECTOR et al., 1999; RECTOR et al., 2000; TERRY et al., 2000; BOERMA; WALKER, 2005; ZHU et al., 2006). Contudo, nenhum trabalho de mapeamento de genes e/ou QTLs associados à resistência da soja a percevejos foi relatado na literatura.

Os primeiros mapas genéticos foram construídos com base em marcadores morfológicos e citológicos. Apesar da grande contribuição destes marcadores, sua disponibilidade se restringia basicamente às espécies modelo. Além disso, estes marcadores não são neutros em relação a possíveis efeitos fenotípicos, epistáticos e pleiotrópicos e, em geral, são dominantes ou recessivos. Sobretudo, o número de marcadores morfológicos é muito baixo, impossibilitando uma eficiente cobertura dos genomas (STUBER et al., 1992). O desenvolvimento dos marcadores moleculares, no início da década de 80, representou grande avanço no conhecimento dos caracteres quantitativos devido à disponibilidade de número suficiente de marcadores para a associação aos diferentes alelos da espécie em estudo. Com isso, mapas genéticos foram construídos para várias espécies possibilitando o mapeamento de QTLs e permitindo, dessa forma, o acompanhamento da segregação de genes responsáveis por caracteres quantitativos em nível individual. Os marcadores moleculares apresentam algumas vantagens: são estáveis, comprovadamente informativos e não sofrem efeitos ambientais, epistáticos ou pleiotrópicos.

Diversos marcadores moleculares têm sido utilizados na construção de mapas genéticos. O AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) é uma classe de marcadores que alia a especificidade dos marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) à praticidade da amplificação da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (VOS et al., 1995). A técnica baseia-se na digestão do DNA genômico por meio de duas enzimas de restrição e ligação de adaptadores específicos com terminais complementares às extremidades coesivas do sítio de restrição. Os fragmentos digeridos e ligados aos adaptadores são amplificados por PCR com *primers* pré-seletivos com sequência complementar aos adaptadores, visando aumentar a proporção de fragmentos de interesse com os sítios de restrição utilizados inicialmente. Posteriormente, é feita uma amplificação com *primers* contendo nucleotídeos seletivos na extremidade 3'. Apesar do caráter dominante deste marcador sua utilização na construção de mapas genéticos tem sido frequente, devido à grande quantidade de informação gerada em um único gel, o que permite a rápida saturação de mapas, como verificado em cevada (QI; STAM; LINHOUT, 1998), alfafa (JULIER et al., 2003), arroz

(MAHESWARAN et al., 1997), milho (VUYLSTEKE et al., 1999), pêssego (LU et al., 1998) e maracujá-amarelo (LOPES et al., 2006).

Apesar da disponibilidade de diferentes marcadores para construção de mapas genéticos de ligação, grande parte da informação obtida é oriunda de polimorfismos em regiões do genoma detectadas por marcadores aleatórios. Entretanto, a crescente disponibilidade de sequências de genes depositadas em bancos de dados, aliada às ferramentas de bioinformática, permitem a detecção de marcadores moleculares mais próximos a genes candidatos. A utilização de marcadores funcionais, baseados em genes-alvo, aumenta a probabilidade de se estabelecer correlações entre fenótipo e genótipo, pois a variabilidade observada pelos marcadores reflete diferenças fenotípicas. Recentemente, Hu e Vick (2003) desenvolveram a técnica TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*), um marcador dominante, que combina a facilidade dos marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), sendo, porém, altamente reproduzível, com abundante polimorfismo dos marcadores AFLP. A metodologia TRAP utiliza ferramentas de bioinformática e ESTs (*Expressed Sequence Tags*) para gerar marcadores polimórficos ao redor de sequências de genes candidatos. O polimorfismo é gerado a partir da combinação de um *primer* fixo, desenhado a partir de uma sequência EST de interesse, e um *primer* arbitrário. Trabalhos recentes relatam o emprego de marcadores TRAP no mapeamento genético, como no caso da macho-esterilidade em girassol (CHEN et al., 2006), identificação dos principais genes de resistência que controlam ferrugem e antracnose em feijão (MIKLAS et al., 2006) e identificação de QTLs que condicionam qualidade e resistência a doenças em trigo (LIU et al., 2005).

Mutações de ponto, inserções ou deleções em regiões do genoma também têm sido frequentemente observadas, sendo denominadas SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*). Os SNPs consistem em alterações de uma única base entre fragmentos homólogos de DNA, além de pequenas inserções ou deleções, podendo ocorrer tanto em regiões codificadoras como em não codificadoras do genoma. Em regiões codificadoras, quando resultam em uma substituição de aminoácido na sequência protéica, são denominados não sinônimos. Neste caso, a substituição pode ser conservativa ou não conservativa em função das características dos aminoácidos

envolvidos na troca, podendo resultar em modificações estruturais e funcionais na proteína. Embora os SNPs sinônimos não alterem a sequência protéica, eles podem modificar a estrutura e a estabilidade do RNA mensageiro e, conseqüentemente afetar a quantidade de proteína produzida. As transições, ou seja, trocas entre duas purinas (A/G ou G/A) ou duas pirimidinas (C/T ou T/C) são mais comuns do que as transversões, as quais consistem na troca de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa. Algumas vezes, as alterações das bases nitrogenadas têm origem em erros de incorporação de bases durante a replicação do DNA, ou podem ser causadas por lesões no DNA por agentes ambientais. As mutações que ocorrem em células germinativas e são transmitidas às gerações seguintes podem se fixar na população. Quando a mutação está fixada em uma frequência mínima de 1% é considerada um SNP (KWOK; GU, 1999). A detecção de SNPs em *Arabidopsis thaliana* e em milho (*Zea mays*) forneceram estimativas da diversidade das sequências destas espécies (SCHMID et al., 2003; CHING et al., 2002; BHATTRAMAKKI et al., 2002). Em soja, a utilização dos SNPs tem sido feita, principalmente, visando definir a estrutura de alguns genes, suas funções e relações evolutivas (SCALLON; DICKINSON; NIELSEN, 1987; XUE et al., 1992; ZAKHAROVA; EPISHIN; VINETSKI, 1989; ZHU et al., 1995; ZHU et al., 2003) e em estudos de mapeamento (CHOI et al., 2007; KACZOROWSKI et al., 2008; HYTEN et al., 2009; HYTEN et al., 2010).

Para a construção de mapas genéticos são utilizadas, geralmente, populações segregantes a partir do cruzamento de genitores contrastantes para o caráter a ser avaliado, visando a identificação de marcadores polimórficos entre os mesmos. Para a formação dos grupos de ligação é necessário testar estatisticamente se o valor da frequência de recombinação difere de 0,5 através do uso do teste de razão de verossimilhança (LR), ou equivalentes como o índice conhecido como *LOD-score* (*Logarithm of Odds*) (LYNCH; WALSH, 1998). Diversas metodologias para o mapeamento de QTLs foram desenvolvidas, com sucessivo avanço tanto em relação ao número de informações obtidas como em relação à precisão das mesmas. O método de análise mais simples é a análise de marcas individuais (EDWARDS; STUBER; WENDEL, 1987), na qual um marcador X é relacionado com um loco Y (possível QTL) a uma fração r de recombinação entre eles. Porém, o fato de não haver independência

nos testes de hipótese para marcadores ligados faz com que não haja precisão no efeito e posição do QTL (LIU, 1998). Outra metodologia consiste no mapeamento por intervalo simples ou IM (*Interval Mapping*) (LANDER; BOTSTEIN, 1989) que se baseia na frequência de recombinações de um par de marcadores adjacentes e um suposto QTL localizado entre eles. Apesar de ser o método mais utilizado seu poder estatístico é relativamente baixo, o que é explicado, em parte, pela não independência dos diferentes intervalos quando existe mais de um QTL. O mapeamento por intervalos compostos ou CIM (*Composite Interval Mapping*), proposto por Zeng (1994), combina mapeamento por intervalos simples e regressão linear múltipla e acaba resolvendo alguns problemas existentes no mapeamento por marcas individuais e no mapeamento por intervalos simples. Por se concentrar em uma região genômica por vez, a busca por QTLs é reduzida a uma busca unidimensional e as estimativas da localização dos QTLs e seus efeitos ficam sem viés. A resolução da localização dos QTLs usando-se métodos condicionados a marcadores ligados são muito maiores que nas técnicas anteriores. Logo, a mais importante característica desse tipo de mapeamento é que os marcadores podem ser utilizados como delimitadores para deixar mais clara a posição dos QTLs, através de um adensamento, que pode ser feito por uma abordagem de agrupamentos segregantes (LIU, 1998).

Uma das principais aplicações da tecnologia dos marcadores moleculares consiste em utilizar as informações obtidas com o mapeamento de QTLs no processo de seleção de genótipos superiores em programas de melhoramento, o que é denominado seleção assistida por marcadores (SAM). Diversos trabalhos sobre o uso da SAM já foram conduzidos em diferentes espécies, entretanto, os resultados até então relatados em literatura não permitem concluir sobre a eficiência da técnica em relação às metodologias convencionais de melhoramento, sendo reportados tanto sucessos (FALEIRO et al., 2004; LIANG et al., 2004) quanto insucessos (MOREAU; CHARCOSSET; GALLAIS, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cruzamento dos genitores para obtenção da geração F₁

Para a escolha dos genitores foi considerado, primeiramente, o critério de resistência e suscetibilidade ao complexo de percevejos, de acordo com dados obtidos em literatura. Posteriormente, outros caracteres agronômicos desejáveis foram observados visando à associação de um maior número de alelos favoráveis na população a ser sintetizada. A cultivar IAC-100 foi desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Campinas, do Estado de São Paulo. Esta cultivar apresenta resistência ao complexo de percevejos (ROSSETTO, 1989; PINHEIRO, 1993; CARRAO-PANIZZI; KITAMURA, 1995), além de outras características agronômicas desejáveis como: resistência ao besourinho (*Diphaulaca viridipennis*), boa produtividade, baixa retenção foliar e poucas manchas nas sementes, mesmo na presença de uma grande infestação de percevejos (APASSUL, 2008). A cultivar CD-215 é uma cultivar protegida pela Cooperativa Central Agropecuária de Desenvolvimento Tecnológico e Econômico Ltda, do Estado do Paraná. Essa cultivar é suscetível ao complexo de percevejos. Entretanto apresenta resistência ao cancro da haste, resistência moderada ao oídio e tolerância à acidez do solo (COODETEC, 2009). A semeadura dos genitores foi realizada em vasos em outubro de 2007, no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), localizado no município de Piracicaba, SP. Os cruzamentos para obtenção da geração F₁ foram realizados artificialmente em casa-de-vegetação, entre novembro de 2007 e janeiro de 2008, sob condições controladas de temperatura e irrigação (Figura 1).

Figura 1 - À esquerda, vasos com os genitores IAC-100 e CD-215; À direita um cruzamento sendo realizado entre estas cultivares

3.2 Obtenção da geração F_2

Durante o inverno de 2008, as sementes F_1 , derivadas dos cruzamentos entre IAC-100 e CD-215, foram semeadas em casa de vegetação. Tal semeadura gerou, através de autopolinização natural, a geração F_2 que foi utilizada para a construção do mapa genético (Figura 2).

Figura 2 - Avanço de gerações: à esquerda foto de uma planta F_1 , do cruzamento entre IAC-100 e CD-215, com vagens contendo sementes F_2 ; à direita, foto do telado com vasos de plantas F_1 para obtenção das sementes F_2

3.3 Condução da geração F_2

Para garantir a germinação das sementes e evitar atrasos na condução do experimento, as sementes da geração F_2 e dos genitores (IAC-100 e CD-215) foram

germinadas em câmara tipo BOD a 28°C, com luz constante, no dia 15/12/2008. Além disso, para evitar a perda de sementes, as mesmas foram tratadas com fungicida, evitando o ataque de patógenos (Figura 3). Posteriormente, as plântulas foram transplantadas para bandejas de isopor no dia 19/12/2008, em casa de vegetação, até adquirirem um tamanho ideal para serem levadas ao campo (Figura 4).

Figura 3 - À esquerda, foto da câmara tipo BOD com as sementes em papel de germinação após tratamento com fungicida; À direita, as plântulas após quatro dias de germinação sob temperatura constante de 28°C e com iluminação constante

Figura 4 - Transplante das plântulas para bandejas de isopor com 72 células, contendo substrato, em casa de vegetação, sob temperatura e irrigação controladas

3.4 Fenotipagem da geração F₂

A avaliação fenotípica foi realizada em 300 indivíduos da geração F₂, para garantir um tamanho populacional adequado para a avaliação genotípica. Além disso, foram incluídas 29 plantas do genitor CD-215 e 30 plantas do genitor IAC-100, totalizando um experimento com 359 plantas. O experimento foi instalado no dia 30/12/2008, em uma área homogênea localizada na Estação Experimental do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) localizada no município de Anhembi, SP. A metodologia adotada foi a de semeadura em covas, sendo a parcela experimental constituída de cova única, ou seja, com somente uma planta. O delineamento inteiramente casualizado foi adotado, sendo a distância entre covas de 20 cm nas linhas úteis e a distância entre as linhas úteis de 1,5 m. Intercalando as linhas úteis do experimento foram semeadas duas linhas de bordadura, utilizando a cultivar BRS133, para evitar o pisoteio das parcelas de covas durante as avaliações e aproximar as condições ambientais de um cultivo comercial (Figuras 5 e 6).

Figura 5 - Croqui experimental exemplificando os espaçamentos utilizados e as linhas de bordadura intercalando as linhas úteis

Figura 6 - Área experimental em dois estágios de desenvolvimento da soja: à esquerda podem ser observadas as linhas úteis formadas por plantas menores (estacas de bambu), ladeadas por duas linhas de bordadura; à direita as plantas estão em estágio de desenvolvimento mais avançado

Os dez caracteres agronômicos avaliados para cada planta foram:

- **NDF:** número de dias para o florescimento contados da semeadura até a antese da primeira flor;
- **APF:** altura da planta (cm) no início do florescimento, medida desde a base da planta (no solo) até o ápice da haste principal;
- **NDM:** número de dias para a maturidade contados desde a semeadura até a data em que 95% das vagens apresentaram-se maduras;
- **APM:** altura da planta (cm) na maturidade, medida desde a base da planta (no solo) até o ápice da haste principal;
- **PEG:** período de enchimento de grãos (dias) obtido pela diferença entre R7 (término do enchimento de grãos) e R5 (início do enchimento de grãos);
- **AC:** acamamento avaliado na maturidade por uma escala de notas visuais de 1 a 5, sendo a nota 1 correspondente à planta ereta e a 5 à planta acamada;
- **VA:** valor agronômico avaliado na maturidade através de uma escala de notas visuais de 1 a 5, sendo a nota 1 correspondente à planta sem nenhum valor agronômico e a nota 5 à planta com excelentes características agronômicas (grande número de vagens, altura superior a 60 cm, vigor, sem acamamento, ausência de hastes verdes e retenção foliar, sem debulha de vagens e sem sintomas de doenças);
- **NVP:** número de vagens por planta, correspondendo à somatória de todas as vagens (planas, intermediárias e boas);
- **PG:** produtividade de grãos avaliada pelo peso dos grãos (g) de cada planta;
- **PCS:** peso de cem sementes (g) a partir de uma amostra ao acaso após padronização da umidade.

Foram avaliados cinco caracteres associados à resistência aos insetos:

- **RF:** retenção foliar avaliada visualmente na maturidade por uma escala de notas visuais de 1 a 5, sendo a nota 1 a planta sem retenção foliar e 5 a planta com total retenção foliar;
- **NS:** número de sementes contadas para cada planta individualmente após a colheita e beneficiamento dos grãos;

- **IPDV:** índice percentual de danos nas vagens, correspondendo à somatória da percentagem de vagens planas (sem enchimento de grãos) e metade da percentagem de vagens intermediárias (com falhas no enchimento de grãos);
- **PSM:** percentagem de sementes manchadas para cada planta, obtida após a colheita pela contagem das sementes com danos provocados pela levedura transmitida pelos percevejos;
- **PSB:** peso de sementes boas (g), ou seja, sem danos provocados por percevejos, avaliado após a colheita e beneficiamento dos grãos;

Os dados referentes aos caracteres RF, AC e VA foram avaliados através de notas visuais e os caracteres PSM e IPDV em percentagem. Por esta razão, tais dados foram transformados para aproximação à distribuição normal, utilizando $\sqrt{x}$ para notas e $\arcsen \sqrt{\%}$ para percentagem, para a realização das análises de variância.

Não foi realizado o controle químico de insetos e, após o florescimento, o nível de infestação de percevejos foi avaliado semanalmente pelo método do pano de batida (Figura 7), durante dez semanas, sendo feitas 20 batidas por dia de avaliação, totalizando 200 amostragens.

Figura 7 - Avaliação da infestação de percevejos pelo método do pano de batida: à esquerda, o pano (1 m x 0,5 m) era posicionado entre duas linhas de bordadura e o número de percevejos por batida contabilizado após a amostragem; à direita, um exemplar da espécie *Nezara viridula*

3.5 Extração de DNA

Das 300 plantas F_2 que foram conduzidas no campo, 14 apresentaram problemas de desenvolvimento e foram excluídas das análises. Portanto, para a genotipagem e construção do mapa genético foram utilizadas 286 plantas da geração F_2 , além de plantas dos genitores IAC-100 e CD-215. Foram realizadas coletas semanais de folhas jovens de cada planta, a fim de garantir a extração de DNA em quantidade adequada à execução de todo o projeto. As folhas foram alocadas em tecido organza e liofilizadas durante três dias, sendo posteriormente armazenadas em freezer -80°C . O DNA genômico total foi extraído de acordo com o método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). A qualidade e concentração do DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% tratado com *SYBR Safe*, por comparação com o DNA-padrão do fago lambda.

3.6 Genotipagem da geração F_2

3.6.1 Marcadores AFLP

Os marcadores AFLP foram utilizados visando saturar o mapa genético de modo a aumentar o poder na detecção de QTLs. A metodologia seguiu a proposta por Vos et al. (1995).

Digestão do DNA

Aproximadamente 250ng do DNA obtido de cada indivíduo da população F_2 foi digerido em uma mesma reação com 2,5 unidades de cada enzima *EcoRI* (Invitrogen) e *MseI* (Invitrogen) em Tampão 1X (50mM Tris-HCl pH 8,0 e 10mM MgCl_2) por 3 horas a 37°C e, em seguida, por 15 minutos a 70°C . O produto obtido foi visualizado em gel de agarose 1% tratado com *SYBR Safe* para confirmação da digestão.

Ligação dos adaptadores e pré-amplificação

Adaptadores específicos aos cortes das enzimas *EcoRI* e *MseI*, obtidos em literatura (Tabela 1), foram sintetizados e diluídos nas concentrações de 5pMol/ μl e 50pMol/ μl , respectivamente. Imediatamente antes do uso, os adaptadores foram

aquecidos a 94°C por 2 minutos. Em seguida, foram ligados ao DNA digerido pela seguinte reação: Tampão 1X da enzima T4 [10mM TrisHCl (pH 7,5), 50mM KCl, 1mM DTT e 50% (v/v) glicerol], 0,17mM de ATP, 0,83µM de adaptadores *MseI*, 0,083µM de adaptadores *EcoRI* e 0,5U da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen), incubados a 37°C por 2 horas e, logo após, a 16°C por 16 horas. A pré-amplificação foi realizada com iniciadores para cada uma das enzimas, sem adição de nucleotídeos seletivos (Tabela 1), em uma reação de volume total de 15µl, contendo 2µl do produto de ligação diluído 6X, Tampão 1X de PCR (50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl, pH 8,9), 0,2mM de cada dNTP, 2,0mM de MgCl₂, 3,33µM do iniciador *EcoRI*+0, 3,33µM do iniciador *MseI*+0 e 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas). As reações foram realizadas em termociclador Bio-RAD (MyCycler, Bio-RAD, EUA), programado para realizar 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto em reação. O produto obtido foi verificado em gel de agarose 1% tratado com *SYBR Safe*.

Tabela 1 - Adaptadores das enzimas *EcoRI* e *MseI* e iniciadores da pré-amplificação (sem nucleotídeo seletivo: +0) e amplificação seletiva (com três nucleotídeos: +3)

Enzima		Sequências	
<i>EcoRI</i>	Adaptador A	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'	
	B	5'-AATTGGTACGCAGTC-3'	
	<i>Eco</i> +0	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'	
	<i>Eco</i> +3	5'-GACTGCGTACCAATTCNNN-3'	
<i>MseI</i>	Adaptador A	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'	
	B	5'-TACTCAGGACTCAT-3'	
	<i>Mse</i> +0	5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'	
	<i>Mse</i> +3	5'-GATGAGTCCTGAGTAANNN-3'	

Primers e amplificação seletiva

A amplificação seletiva foi realizada com iniciadores contendo três nucleotídeos seletivos na extremidade 3' (Tabela 2). Foram utilizadas 14 combinações de *primers* *Eco*+3 e *Mse*+3 a partir de um *screening* realizado nos genitores. As reações foram realizadas em volume total de 15µl, contendo 1,5µl do produto da pré-amplificação diluído 10X, Tampão 1X de PCR, 0,2mM de cada dNTP, 2,0mM de MgCl₂, 1,33µM de cada iniciador *EcoRI*+3 e *MseI*+3 e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas). O

termociclador foi programado para realizar 13 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C (-0,7°C/ciclo) por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido por 23 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, finalizando com uma extensão final a 72°C por 8 minutos. Os produtos de amplificação dos marcadores AFLP foram separados sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida 7%, uréia 7M, TBE 1X, por aproximadamente 4 horas a uma potência constante de 70W. Os fragmentos foram detectados por coloração em nitrato de prata, segundo protocolo Merrill et al. (1981), com as modificações propostas por Creste, Tulmann Neto e Figueira (2001), e seus tamanhos estimados por meio de comparação com marcadores de pares de base. As marcas obtidas foram lidas como presença (1) e ausência (0) por se tratar de um marcador dominante.

Tabela 2 - Quatorze combinações de *primers* com adição de três nucleotídeos seletivos (*Eco*+3/*Mse*+3) utilizadas para genotipagem da população F₂

<i>Eco</i> +3/ <i>Mse</i> I+3	<i>Eco</i> +3/ <i>Mse</i> I+3
ACC/CTG	AAC/CAG
ACC/CTC	AAG/CTG
ACT/CTG	AAG/CTC
ACT/CTC	AAG/CAA
ACT/CAT	AAG/CTA
AAC/CTT	AAG/CAG
AAC/CAT	ACA/CAT

3.6.2 Busca de genes em banco de dados

Para a amplificação dos marcadores funcionais TRAP e SNP foi realizada uma busca em literatura de genes envolvidos na rota metabólica de resistência das plantas a insetos. As palavras-chave foram inseridas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e as sequências dos oligonucleotídeos resultantes da busca foram retidas para posterior associação aos *primers* complementares. A busca foi realizada através das palavras-chave: resistência em soja, lipoxigenases (LOX1, LOX2 e LOX3) (SHIBATA et al., 1987; SHIBATA et al., 1988 e VENOFKY; FINE; LIU, 1988), lipoxigenases VLX A, B, C, D e E (BUNKER et al., 1995), ácido jasmônico, sisteminas, inibidor de proteinase (PINII), fitoalexinas, betaína,

aquaporina, ácido linolênico, polifenol oxidase, jasmonatos (FIDANTSEF et al., 1999), RGA, proteína RNEAU-1, proteína FBOX, proteína HS1, proteína HAAS-4, calmodulina, urease, WRKY (EULGEM et al., 1999; EULGEM et al., 2000) e genes envolvidos na resposta sistêmica da defesa de plantas a ferimentos, como os descritos para tomate (RYAN, 2000).

3.6.3 Desenho de *primers* complementares aos genes alvo

Com o auxílio dos programas TROLL (GAO; CASTELO; MARTINS, 2002) (<http://www.bioinformatica.ucb.br/troll.html>) e Primer3 (ROZEN; SKALETISKY, 2000) (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>), as sequências retidas foram utilizadas como alvos para desenho e construção de oligonucleotídeos para permitir a amplificação dos marcadores TRAP e SNP. Os seguintes critérios adaptados de Rafalski et al. (1996) foram utilizados na escolha dos *primers*: (1) as sequências flanqueadas não deveriam ultrapassar 22pb para reduzir os custos de síntese; (2) no máximo 3°C de diferença entre as T_m dos pares de *primers*; (3) o conteúdo de GC deveria estar entre 40% a 60%; (4) ausência de complementaridade entre os *primers*; (5) a T_m não deveria ser inferior a 46°C e com uma concentração de sal de 50mM.

3.6.4 Marcadores TRAP

Para a amplificação dos marcadores TRAP foram utilizadas 11 combinações de *primers* fixo/arbitrário. Os *primers* arbitrários, utilizados com *Reverse*, foram obtidos em literatura (Tabela 3) e os *primers* fixos, utilizados como *Foward*, foram desenhados no Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento (K.C. Brioschi, dados não publicados) a partir da busca em banco de dados de genes envolvidos na resistência de plantas (Tabela 4).

Tabela 3 - Sequências dos cinco *primers* arbitrários (*Reverse*), obtidos em literatura, utilizados para a amplificação de marcadores TRAP

Iniciador	Sequência	Referência
Ga5	5'-GGAACCAAACACATGAAGA-3'	LIU et al. 2005
Odd-26	5'-CTATCTCTCGGGACCAAAC-3'	ZHI-WEI et al. 2007
Arbi 2	5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'	ALWALA et al. 2006
T04	5'-CGTAGTGATCGAATTCTG-3'	LIU et al. 2005
T03	5'-CGTAGCGCGTCAATTATG-3'	LIU et al. 2005

Tabela 4 - Sequências dos 12 *primers* fixos (*Foward*) utilizados para a amplificação de marcadores TRAP

Iniciador	Nº GenBank	Palavra-chave	Sequência
KB10	BM094898	<i>Glycine max and jasmonic acid</i>	5'-GATGATTGGGTTCTGTGTCG-3'
KB16	GR860132	<i>Glycine max and sistemine</i>	5'-ATCCTCTTCCCAAACAAAGC-3'
KB40	GR860209	<i>Glycine max and betaine</i>	5'-TCTGTCGTTTGTCTCTTGATC-3'
KB44	BG882005	<i>Glycine max and urease ubíqua</i>	5'-ACACTGAATGGCTGGTGAAG-3'
KB53	BM093720	<i>Glycine max and polyphenol oxidase</i>	5'-CTCGTTTGGTTCCATTGTTGT-3'
KB56	BI095220	<i>Glycine max and urease</i>	5'-CACTGAATGGCTTCTGAAGG-3'
KB65	GR860149	<i>Glycine max and WRKY27</i>	5'-TGTGCCACTTAGGTCACCAG-3'
KB66	AB126934	<i>Phytoalexins</i>	5'-AAGCTGTAGCCCGTTCCA-3'

Nota: Iniciadores desenhados a partir de sequências depositadas no *GenBank* (K.C. Brioschi, dados não publicados).

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Bio-RAD (MyCycler, Bio-RAD, EUA) com volume final de 15µl contendo: 100ng de DNA, Tampão 1X de PCR, 0,2mM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl₂, 0,8µM do *primer* fixo, 0,8µM do *primer* arbitrário e 1,5U de Taq DNA polimerase (Fermentas). O ciclo de amplificação consistiu em uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguida de cinco ciclos de 94°C por 45 segundos, 35°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 50°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto, com extensão final de 72°C por 8 minutos. Os produtos de amplificação dos marcadores TRAP foram separados sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida 7%, uréia 7M, TBE 1X, por aproximadamente 5 horas a uma potência constante de 70W. Os fragmentos foram detectados por coloração em nitrato de prata, segundo protocolo

Merril et al. (1981), com as modificações propostas por Creste, Tulmann Neto e Figueira (2001), e seus tamanhos estimados por meio de comparação com marcadores de pares de base. As marcas obtidas foram lidas como presença (1) e ausência (0) por se tratar de um marcador dominante.

3.6.5 Marcadores SNP

Para a detecção de mutações e deleções/inserções do tipo SNP foram desenhados e sintetizados 24 pares de *primers* a partir de genes-alvo selecionados no banco de ESTs (Tabela 5). A amplificação dos parentais IAC-100 e CD-215 foi feita em termociclador Bio-RAD (MyCycler, Bio-RAD, EUA) com volume final de 50µl contendo: 330ng de DNA, Tampão 1X de PCR, 0,2mM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl₂, 0,4µM do *primer* fixo, 0,4µM do *primer* arbitrário e 1U de Taq DNA polimerase (Fermentas). O ciclo de amplificação consistiu em uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguida de 32 ciclos de 94°C por 1 minuto, gradiente de 55 a 61°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto, com extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 2%, tratado com *SYBR Safe* para confirmação da amplificação de apenas uma banda. Posteriormente, os produtos de amplificação foram purificados e utilizados na reação com Kit de sequenciamento Big-Dye Terminator v.3.1 com o *primer Forward*. O sequenciador utilizado foi o modelo 3730 da Applied Biosystems. Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa *Codon Code Aligner* (Disponível em: <http://www.codoncode.com>) para verificação da presença de substituições, indivíduos heterozigotos e inserção/deleção de bases nitrogenadas. Para verificar se o SNP era verdadeiro ou resultante de erro do sequenciamento foi utilizada uma ferramenta do programa que verifica a qualidade do sequenciamento.

Tabela 5 - Sequências dos 24 pares de *primers* desenhados para a amplificação de marcadores SNP

Iniciador	Nº GenBank	Palavra-chave	Sequência	
SNP1	NC012019	<i>Aquaporin</i>	<i>Foward</i>	5'-CCAACAAGACAAAGCCACAA-3'
			<i>Reverse</i>	5'-TTAAACCACCCCCACTATCC-3'
SNP2	NW002238093	<i>Aquaporin</i>	<i>Foward</i>	5'-TCTTTGCCTAGTGTTTTTCTGC-3'
			<i>Reverse</i>	5'-CTCCATCAACTACCTCCTTCAA-3'
SNP3	BW663235	<i>Calmodulin</i>	<i>Foward</i>	5'-CTTTCTCGCTCGCCAAAC-3'
			<i>Reverse</i>	5'-AGAGATGAAACCATTCTGATCC-3'
SNP4	FG068093	<i>Calmodulin</i>	<i>Foward</i>	5'-CTCAGCAGCAAATAACCAACA-3'
			<i>Reverse</i>	5'-GGGGTCCTCATCATAACCAA-3'
SNP5	BW666261	<i>Calmodulin</i>	<i>Foward</i>	5'-TGCATGGTGAGACACATCTAA-3'
			<i>Reverse</i>	5'-CAATCTCGGTGAGAAAGCTG-3'
SNP6	BW676502	<i>Calmodulin</i>	<i>Foward</i>	5'-TCACATCGCAGAGAAGAACA-3'
			<i>Reverse</i>	5'-AAAGCCGACCAACAAAAACT-3'
SNP7	BW676503	<i>Calmodulin</i>	<i>Foward</i>	5'-TGCATGGTGAGACACATCTAA-3'
			<i>Reverse</i>	5'-TGCAGGACATGATAAATGAGG-3'
SNP8	AJ276866	<i>Embrio specific urease</i>	<i>Foward</i>	5'-GTGCGTCCGTATTCTTAAGC-3'
			<i>Reverse</i>	5'-CCCTAGCATTTTCTCTTCC-3'
SNP9	AY143592	<i>Embrio specific urease</i>	<i>Foward</i>	5'-GCAAGCAAATGAAGGACACA-3'
			<i>Reverse</i>	5'-AGCCCTGCACAGTATCTAGC-3'
SNP10	AY230157	<i>Embrio specific urease</i>	<i>Foward</i>	5'-GCATTGGGAAACATCTATTGG-3'
			<i>Reverse</i>	5'-CACCAAGACGGATTTTGTCA-3'
SNP11	CF972516	<i>FBOX Protein</i>	<i>Foward</i>	5'-GGTGCTAAGATCCAAAGTCG-3'
			<i>Reverse</i>	5'-CGTTACTCATGTCTAGCATTCTC-3'
SNP12	AY750712	<i>HAAS-4 Protein</i>	<i>Foward</i>	5'-GGAACAGAGGGGTTGAGAGA-3'
			<i>Reverse</i>	5'-CAGAAAGTGCAAAAACGACA-3'
SNP13	EU836688	<i>HS1pro1</i>	<i>Foward</i>	5'-CTAGATTGGCAAACAAGATGG-3'
			<i>Reverse</i>	5'-CCGACTCCGTTACTCTCTCC-3'
SNP14	AJ272026	<i>Jasmonate</i>	<i>Foward</i>	5'-TTTGACCGCTAGAACCAACA-3'
			<i>Reverse</i>	5'-CCGCCGTACACAACAATTTC-3'
SNP16	DQ369739	<i>Jasmonate</i>	<i>Foward</i>	5'-TCCTCTTCTTCTCTTACCA-3'
			<i>Reverse</i>	5'-GATCAATGTCGGACCATCAA-3'
SNP41	FJ477235	<i>RGA</i>	<i>Foward</i>	5'-GAGTGGGGAAGACAACAGC-3'
			<i>Reverse</i>	5'-TTCACGGAGGACACTGATTTC-3'
SNP47	AF516649	<i>RGA NBS-LRR</i>	<i>Foward</i>	5'-GGTAAGACAACGATTGCTCAAG-3'
			<i>Reverse</i>	5'-AATGGCAGTCCTCCACAGTAAT-3'
SNP48	AY182243	<i>RNEAU-1 Protein</i>	<i>Foward</i>	5'-GGGGTCGGAAGACAACA-3'
			<i>Reverse</i>	5'-GCAGGCCAGAAGCATAAG-3'
SNP56	DY577292	<i>Soybean Resistance</i>	<i>Foward</i>	5'-GTGTGCTACGTTGTCGGTTT-3'
			<i>Reverse</i>	5'-AGAATTGGGAAGAGCCTGAG-3'
SNP58	EE399960	<i>Soybean Resistance</i>	<i>Foward</i>	5'-GGTGTTATCCCCAAATGCTT-3'
			<i>Reverse</i>	5'-GGCCCAGTTAAATCATTGTG-3'
SNP61	AW508990	<i>Urease</i>	<i>Foward</i>	5'-GATCCACCTGCAATCTCCT-3'
			<i>Reverse</i>	5'-ATGCTGCAATGCTATGTTTCG-3'
SNP71	NM_118328	<i>WRKY</i>	<i>Foward</i>	5'-GAGAACATCAACGACGACGA-3'
			<i>Reverse</i>	5'-GTTTCCCCAGGCGTTAGAC-3'
SNP79	EU019564	<i>WRKY20</i>	<i>Foward</i>	5'-CCACAAACCACTCAATCCTAA-3'
			<i>Reverse</i>	5'-GGCATTGTTTCCCTGAGAAC-3'
SNP80	EU665445	<i>WRKY20</i>	<i>Foward</i>	5'-CCACTGCTCCAAGAGAAGG-3'
			<i>Reverse</i>	5'-CGTAGGTCACCACCAGCAT-3'

Nota: Iniciadores desenhados a partir de sequências depositadas no GenBank (dados não publicados).

3.6.6 Comparação dos marcadores AFLP e TRAP

Para determinar a eficiência dos marcadores AFLP e TRAP em detectar o polimorfismo foram calculados: o AEI, *Assay Efficiency Index*, descrito por Pejic et al. (1998) ($AEI = BP/T$, onde BP corresponde ao número total de fragmentos polimórficos detectados e T o número total de combinações utilizadas); a proporção de fragmentos polimórficos (número total de fragmentos polimórficos detectados / número total de fragmentos detectados) e o PIC (*Polymorphism Information Content*). Segundo Satyavathi et al. (2006), $PIC = 1 - (p^2 + q^2)$, sendo p e q as frequências dos alelos. O cálculo do PIC para cada marcador foi feito a partir da média dos valores de PIC obtidos para as marcas de cada combinação.

3.7 Construção do mapa genético

A construção do mapa de ligação foi feita utilizando-se os programas TreeMap® (COELHO, 2005) e Mapmaker versão 3.0 (LANDER et al., 1987). Portanto, foi gerada uma matriz de dados contendo as informações dos 286 genótipos para os marcadores AFLP e TRAP, em formato texto. Para o primeiro programa foi usada a seguinte codificação: “1” para presença de banda, “999” para ausência de banda e “0” para dado perdido; e para o segundo programa: “A” para o genitor homozigoto IAC-100 (genótipo AA), “B” para o genitor homozigoto CD-215 (genótipo BB), “D” para presença de banda proveniente do genitor IAC-100, correspondendo aos genótipos AA ou AB, “C” para presença de banda proveniente do genitor CD-215, correspondendo aos genótipos BB ou AB e “-” para dado perdido. Testes de χ^2 , corrigidos pelo método de Bonferroni foram utilizados para testar o padrão de segregação esperado (3:1) para os marcadores AFLP e TRAP. Para a correção por Bonferroni foi definido o valor de $\alpha=0,05$ para cada teste, tornando possível o cálculo de um novo α^* para os múltiplos testes, como representado na eq.(1),

$$\alpha^* = \frac{\alpha}{m} \quad (1)$$

em que α é o valor para os testes individuais, definido como 0,05, e m corresponde ao número de testes realizados, que é igual ao número de marcadores analisados.

No programa TreeMap® a atribuição dos locos aos grupos de ligação (GL) é baseada em testes de ligação considerando os locos dois a dois (análise de dois pontos). Dessa forma, todos os pares de locos que têm uma distância menor ou igual à distância especificada e um LOD *score* superior ao LOD mínimo pré-estabelecido são considerados ligados. Na construção dos grupos de ligação é utilizada a propriedade transitiva, ou seja, se o loco 1 estiver ligado ao loco 2, e este, por sua vez, estiver ligado ao loco 3, então os locos 1 e 3 pertencem ao mesmo grupo de ligação. Para determinar a ligação dos marcadores aos grupos de ligação foi usado LOD *score* > 4 e frequência de recombinação inferior a 0,35. A função de mapeamento de Kosambi foi utilizada para converter as frequências de recombinação em distâncias de mapa, expressas em centiMorgans (KOSAMBI, 1944). A estatística LOD *score* se baseia na razão de verossimilhanças, em que no denominador é disposta a função de verossimilhança considerando uma distância entre marcas de 0,5 ($r=0,5$; ausência de ligação; hipótese de nulidade) e, no numerador, a função que possui a estimativa de máxima verossimilhança de r (hipótese alternativa). Essa razão é colocada no logaritmo com base 10, sendo esse termo definido como LOD *score*. O termo LOD é a abreviação de *log of the odds*, ou seja, razão de chances (LIU, 1998). A interpretação de um LOD de valor x , por exemplo, é que a hipótese alternativa é 10^x vezes mais provável que a hipótese de nulidade. Após a definição dos grupos de ligação a ordem linear dos marcadores dentro de cada grupo foi determinada usando LOD *score* > 2. As marcas não ordenadas no mapa, de acordo com os critérios estabelecidos, foram adicionadas como marcadores acessórios e alocadas ao lado das marcas do *framework* mais próximas, anotando-se a distância entre elas.

Após a obtenção dos *frameworks* no Treemap®, foi feita a confirmação dos grupos de ligação no programa Mapmaker, que utiliza o método multipontos. A ordem dos marcadores para cada GL foi confirmada através do comando “*ripple*”, o qual estabelece uma janela dentro da qual são feitas trocas entre marcas vizinhas comparando-se a probabilidade das diferentes ordens possíveis. Foi usado como critério de confirmação da ordem um valor de LOD > 2,0. Os GL foram então submetidos à análise multiponto para a determinação das distâncias entre as marcas através do comando “*map*”.

3.8 Mapeamento de QTLs

As análises de QTLs foram realizadas no programa *QTLCartographer*® versão 2.5 (WANG; BASTEN; ZENG, 2010) utilizando-se os grupos de ligação formados, desconsiderando-se as marcas acessórias, e os valores fenotípicos dos 15 caracteres avaliados para cada um dos 286 indivíduos da população F_2 , sendo: NDF (número de dias para o florescimento), APF (altura da planta no florescimento), NDM (número de dias para maturidade), APM (altura da planta na maturidade), PEG (período de enchimento dos grãos), AC (acamamento), VA (valor agrônômico), NVP (número de vagens por planta), PG (produtividade), RF (retenção foliar), NS (número de sementes), IPDV (índice percentual de danos nas vagens), PSM (percentagem de sementes manchadas), PSB (peso de sementes boas), PCS (peso de cem sementes).

3.8.1 Mapeamento por marcas simples

A análise de marcas simples baseia-se na comparação entre as médias dos genótipos marcadores e é feita separadamente para cada loco. Se as médias são diferentes pode-se inferir que pelo menos um QTL encontra-se próximo a este marcador. O modelo utilizado é o de regressão linear conforme eq. (2), sendo “ b_0 ” a média do caráter, “ b_1 ” o quanto o valor de um caráter aumenta ou diminui pela presença da banda e “ e ” o erro aleatório. A presença do QTL é testada determinando-se se b_1 é significativamente diferente de zero. A estatística F compara a hipótese H_0 ($b_1=0$) e H_1 ($b_1 \neq 0$). O p-valor de F é uma medida de quão válido é o H_0 . Dessa forma, quanto menor o p-valor menor a evidência de que H_0 é verdadeiro, portanto, rejeita-se H_0 e aceita-se H_1 .

$$Y = b_0 + b_1 x + e \quad (2)$$

3.8.2 Mapeamento por intervalo composto

A análise de mapeamento por intervalo composto se baseia na hipótese de que em um intervalo flanqueado por duas marcas adjacentes há um QTL afetando a característica, além de considerar os efeitos de QTLs adicionais fora do intervalo sendo

testado, utilizando a regressão múltipla, conforme a eq. (3), na qual “b*” é o efeito aditivo do possível QTL, “x*” é um vetor da variável indicadora, especificando as probabilidades de um indivíduo ter diferentes genótipos para o possível QTL dado o genótipo das marcas flanqueadoras, “B” é um vetor dos efeitos de outras marcas selecionadas no modelo, “X” é a matriz dos genótipos de marcadores selecionados, “E” é um vetor de erros.

$$Y = x^* b^* + XB + E \quad (3)$$

As estimativas dos parâmetros são obtidas por máxima verossimilhança através do algoritmo ECM (*Expectation/Conditional Maximization*) (MENG; RUBIN, 1993). A razão de verossimilhanças (LR) utilizada para testar a hipótese da presença do QTL na posição dentro do intervalo é dada por: $-2\ln(L_0/L_1)$, sendo L_0/L_1 a razão da função de verossimilhança sob a hipótese de nulidade (ausência de QTL) e a hipótese alternativa (presença de QTL). O modelo 6 do módulo “*Zmapqtl*” do *QTLCartographer*® foi utilizado e a presença de QTL foi avaliada a intervalos de 1cM no grupo de ligação, com uma janela de 10cM. Os testes para detecção de QTLs foram realizados utilizando-se valores críticos de LR correspondentes ao nível de significância de 5%, para cada caráter. Os valores críticos de LR para cada caráter foram estimados pelo procedimento descrito por Churchill & Doerge (1994), implementado no *QTLCartographer*®, utilizando-se 500 permutações. A estimação da posição e percentagem da variação fenotípica (R^2) explicada pelos QTLs foram estabelecidas nos picos de LOD acima do nível de significância considerado, de acordo com o *output* do programa. As representações gráficas dos grupos de ligações e dos valores de LOD indicando a presença de QTLs foram obtidas pelo *software MapChart*® (VOORRIPS, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises estatísticas do experimento de campo

Os dados coletados em campo foram submetidos a uma análise de variância realizada através do programa estatístico SAS® versão 9.1. Para os caracteres NDM, APM, AC, VA, PG, PEG, PSB e PCS, o teste F foi altamente significativo a 1%, confirmando haver diferenças significativas entre as médias dos tratamentos (Tabelas 6 e 7). O coeficiente de variação experimental (CV) é um parâmetro que indica a variabilidade dos dados em relação à média. Os valores de CV foram considerados baixos, indicando um conjunto de dados homogêneo, para os caracteres APF, NDM, APM, AC, VA, PEG e PCS. Já para os caracteres PG, RF, IPDV e PSB os valores de CV foram maiores, o que pode ser explicado por um efeito combinado, pois esses caracteres estão diretamente relacionados ao o ataque e distribuição dos percevejos no experimento. Pinheiro (1993) também obteve valores altos de CV para estes caracteres em um experimento que teve como alvo a reação aos insetos sugadores.

Tabela 6 - Análise de variância para os caracteres altura da planta no início do florescimento (APF), número de dias para a maturidade (NDM), altura de planta na maturidade (APM), acamamento (AC), valor agrônômico (VA) e produtividade de grãos (PG)

FV	GL	QM					
		APF (cm)	NDM (dias)	APM (cm)	AC ¹	VA ¹	PG (g/planta)
Tratamento	2	97,87	529,20**	980,57**	0,44**	0,76**	162,39**
Resíduo	347	71,18	11,82	134,33	0,11	0,08	21,58
CV (%)		15,17	3,27	16,51	23,55	15,17	56,01

¹Notas de 1 a 5; Dados transformados $\sqrt{x}$.

**Estatisticamente significativo a 1%.

Tabela 7 - Análise de variância para os caracteres período de enchimento de grãos (PEG), retenção foliar (RF), índice percentual de danos nas vagens (IPDV), peso de sementes boas (PSB) e peso de cem sementes (PCS)

FV	GL	QM				
		PEG (dias)	RF ¹	IPDV (%) ²	PSB (g/planta)	PCS (g)
Tratamento	2	228,66**	0,24	0,04	145,39**	70,41**
Resíduo	347	6,26	0,1	0,01	14,98	5,4
CV (%)		18,21	25,9	30,57	62,00	18,14

¹Notas de 1 a 5; Dados transformados $\sqrt{x}$

²Dados transformados $\arcsen \sqrt{\%}$.

**Estatisticamente significativo a 1%.

A cultivar IAC-100 apresentou um menor período de enchimento dos grãos (Tabela 8), conforme constatado anteriormente por Rossetto et al. (1989). Alguns autores destacam que há uma estreita correlação entre a duração do período reprodutivo e a intensidade do dano causado por percevejos, sendo que genótipos com maior PEG seriam mais danificados por percevejos, devido à maior exposição aos mesmos (DAUGHERTY et al., 1964; JONES; SULIVAN, 1978).

Apesar da cultivar CD-215 ser suscetível ao complexo de percevejos, ela apresenta um mecanismo de mitigação de danos causados por percevejos nas sementes, que nada mais é do que uma maior quantidade de vagens por planta (Tabela 9), resultando em um menor número de sementes manchadas em relação ao IAC-100. A maior quantidade de vagens faz com que os percevejos danifiquem uma menor quantidade de sementes, como ocorreu para as plantas CD-215. Já no caso das plantas IAC-100, que apresentaram menos vagens, a infestação de percevejos atinge um maior percentual das vagens totais da planta, ocasionando um maior dano nas sementes e na produtividade.

Tabela 8 - Média, valor máximo e mínimo e desvio padrão para os caracteres altura da planta no início do florescimento (APF), número de dias para a maturidade (NDM), altura da planta na maturidade (APM), período de enchimento de grãos (PEG), acamamento (AC) e valor agrônômico. Dados transformados

Geração	Parâmetros	APF	NDM	APM	PEG	AC	VA
CD-215	Média	57,79	104,00	66,40	15,17	1,79	3,65
	Máximo	77,00	109,00	88,00	18,00	4,00	5,00
	Mínimo	42,00	98,00	42,50	10,00	1,00	2,00
	Desvio-padrão	8,37	3,82	11,51	2,75	0,96	0,99
IAC100	Média	57,21	110,80	63,80	10,17	2,53	2,83
	Máximo	49,50	118,00	85,00	15,00	5,00	5,00
	Mínimo	35,00	102,00	33,00	6,00	1,00	1,00
	Desvio-padrão	8,54	3,86	11,92	2,73	0,96	1,00
F₂	Média	55,28	104,69	71,42	13,96	2,05	3,60
	Máximo	79,00	116,00	101,00	20,00	5,00	5,00
	Mínimo	28,00	94,00	32,50	6,00	1,00	1,00
	Desvio-padrão	8,22	3,30	11,45	2,56	0,94	0,96

Tabela 9 - Média, valores máximo e mínimo e desvio padrão para os caracteres número de vagens por planta (NVP), produtividade de grãos (PG), retenção foliar (RF), índice percentual de danos nas vagens (IPDV), peso de sementes boas (PSB) e peso de cem sementes (PCS). Dados transformados

Geração	Parâmetros	NVP	PG	RF	IPDV	PSB	PCS
CD-215	Média	27,06	8,15	1,45	14,95	6,40	13,02
	Máximo	55,00	18,50	4,00	28,05	14,84	16,26
	Mínimo	5,00	1,52	1,00	0,00	1,12	9,40
	Desvio-padrão	16,05	4,71	0,94	8,96	3,96	2,40
IAC100	Média	20,51	5,20	1,93	20,34	3,27	10,74
	Máximo	51,00	12,16	5,00	56,25	3,26	15,86
	Mínimo	3,00	0,20	1,00	5,81	0,00	6,67
	Desvio-padrão	13,53	4,76	0,92	9,09	3,99	2,50
F₂	Média	29,58	8,63	1,65	16,20	6,53	13,00
	Máximo	76,00	23,03	5,00	50,00	18,85	22,34
	Mínimo	1,00	0,17	1,00	0,00	0,00	6,33
	Desvio-padrão	15,34	4,68	0,91	8,51	3,96	2,40

4.2 Flutuação populacional de percevejos

Como pode ser observado na Figura 8, a flutuação populacional dos percevejos teve um aumento significativo no período de enchimento dos grãos (R5 - R7). Em geral, a presença dos percevejos na cultura está diretamente relacionada à presença das

vagens nas plantas, cujo período entre o começo da frutificação e o ponto de acúmulo máximo de matéria seca no grão é o de maior sensibilidade da soja ao ataque desses insetos sugadores (GAZZONI, 1998). Após um período de estabilidade, foi verificado ainda um novo aumento na flutuação populacional dos percevejos no final das avaliações, o que pode ser explicado pela colheita da soja em outros experimentos próximos, o que fez com que os percevejos das áreas já colhidas migrassem para o experimento.

Figura 8 - Flutuação média da população de percevejos no experimento durante o período compreendido entre os estágios reprodutivos R₂ e R₈ dos genótipos avaliados

4.3 Genotipagem da população F₂

4.3.1 Marcadores AFLP

A partir das 14 combinações de *primers* AFLP, utilizadas para genotipar a população F₂, foram obtidas 643 marcas, das quais 67 (10,42%) foram polimórficas (Tabela 10 e Figura 9). O número de marcas por combinação variou de dois (E-ACC/M-

CTG) a nove (E-ACT/M-CAT), média de 4,79. Os valores de PIC variaram de 0,30 a 0,44, com média de 0,37.

Tabela 10 - Número total de marcas, número e percentagem de marcas polimórficas e valores de PIC obtidos com as 14 combinações *Eco*+3 e *Mse*+3 genotipadas na população F₂

Combinação		Total Marcas	Marcas Polimórficas	Percentagem de marcas polimórficas	PIC
ACC	CTG	37	2	5,41%	0,34
ACC	CTC	32	6	18,75%	0,31
ACT	CTG	38	4	10,53%	0,38
ACT	CTC	33	5	15,15%	0,42
ACT	CAT	80	9	11,25%	0,39
AAC	CTT	41	3	7,32%	0,41
AAC	CAT	72	7	9,72%	0,44
AAC	CAG	29	4	13,79%	0,36
AAG	CTG	31	3	9,68%	0,36
AAG	CTC	37	2	5,41%	0,44
AAG	CAA	49	3	6,12%	0,35
AAG	CTA	75	7	9,33%	0,39
AAG	CAG	45	6	13,33%	0,35
ACA	CAT	44	6	13,64%	0,30
Total		643	67		
Média		45,93	4,79	10,67%	0,37

Figura 9 - Gel de acrilamida 7% corado com nitrato de prata exemplificando amplificação da combinação E-AAG/ M-CAG na população F₂. Setas indicam marcas polimórficas

4.3.2 Marcadores TRAP

A partir das 11 combinações de *primers* fixo/arbitrário utilizadas foram obtidas 230 marcas, sendo que 31 (13,48%) apresentaram polimorfismo na população F₂ (Tabela 11). O número de marcas por combinação variou de um (Arbi 2/KB40 e Arbi 2/KB44) a seis (Ga5/KB53 e T03/KB56), com média de 2,82 marcas por combinação. Os valores de PIC variaram de 0,21 a 0,47, média de 0,37.

Tabela 11 - Número total de marcas, número e percentagem de marcas polimórficas e valores de PIC obtidos com as 11 combinações de *primer* fixo/arbitário genotipadas na população F₂

Combinação		Total Marcas	Marcas Polimórficas	Percentagem de bandas polimórficas	PIC
Ga5	KB10	27	3	11,11%	0,41
Ga5	KB16	21	2	9,52%	0,21
Ga5	KB44	30	3	10,00%	0,29
Ga5	KB53	22	6	27,27%	0,47
Ga5	KB65	25	2	8,00%	0,39
Odd-26	KB66	16	4	25,00%	0,44
Arbi 2	KB10	19	2	10,53%	0,44
Arbi 2	KB40	15	1	6,67%	0,29
Arbi 2	KB44	15	1	6,67%	0,33
T03	KB44	19	2	10,53%	0,47
T03	KB56	21	5	23,81%	0,32
Total		230	31		
Média		20,91	2,82	13,55%	0,37

4.3.3 Marcadores SNP

Dos 24 pares de *primers* utilizados 10 apresentaram amplificação satisfatória, com amplificação de apenas uma banda (Figura 10). A temperatura mais adequada para a amplificação dos *primers* foi: 61°C para SNP3, SNP5, SNP6, SNP7, SNP9, SNP11, SNP13 e SNP58; 59°C para SNP79 e 60°C para SNP80. Apenas as sequências obtidas com os *primers* SNP11 e SNP79 apresentaram boa qualidade de sequenciamento e foram utilizadas para análise de presença de SNP, com posterior verificação na população F₂. As outras sequências foram descartadas devido à baixa qualidade e presença de contaminação o que comprometeria a análise de SNP. A presença de SNPs foi verificada pelo programa *Codon Code Aligner* pelo alinhamento e comparação das sequências. Para o SNP11 e SNP79 os genitores IAC-100 e CD-215 apresentaram polimorfismo e segregação da população F₂ para dois e quatro locos, respectivamente. Entretanto, o tipo de polimorfismo observado não foi informativo, não sendo possível a associação dos mesmos ao mapa, já que para esses seis locos sempre um dos genitores é heterozigoto. Portanto, não é possível identificar se o genótipo F₂ recebeu desse genitor um gameta recombinante ou parental, pois os

gametas produzidos são os mesmos tanto na presença quanto na ausência de *crossing over*.

Figura 10 - Gel de agarose 2%, tratado com *SYBR Safe*, da amplificação dos 10 *primers* SNP nos genitores IAC-100 (1) e CD-215 (2)

4.3.4 Comparação dos marcadores AFLP e TRAP

Os marcadores TRAP apresentaram um menor índice de eficiência (AEI) (ou seja, uma menor quantidade de marcas polimórficas por combinação) em relação aos marcadores AFLP (Tabela 12), o que pode ser explicado pela natureza dos *primers* fixos utilizados, os quais foram desenhados a partir de sequências expressas. Consequentemente, a amplificação destes locos tende a apresentar um menor número absoluto de marcas polimórficas entre os indivíduos por geralmente se tratarem de regiões conservadas do genoma. Tal fato também contribuiu para uma maior proporção de marcas polimórficas deste marcador em relação ao AFLP, pois uma menor quantidade de locos (polimórficos e monomórficos) é amplificada, fazendo com que grande parte das marcas sejam polimórficas em relação ao total de marcas amplificadas. Liu et al. (2005) utilizaram marcadores TRAP na construção de um mapa genético em trigo e também observaram uma percentagem de marcas polimórficas de 13 a 16% em 30 combinações de *primers* fixo/arbitrário, mostrando coerência com os resultados encontrados no presente trabalho.

Tabela 12 - Nível de polimorfismo e informatividade obtida com os marcadores AFLP e TRAP para as 286 plantas F₂

Parâmetros	Marcadores	
	AFLP	TRAP
Nº combinações	14	11
Nº total marcas detectadas	643	230
Nº marcas polimórficas	75	34
Índice de Eficiência do Marcador (AEI)	5,36	3,09
Proporção de marcas polimórficas	0,12	0,15

De acordo com os valores de PIC obtidos para estes marcadores, a variabilidade observada na população F₂ foi moderada, com média de 0,37 para ambos os marcadores. Satyavathi et al. (2006) obteve valores semelhantes de PIC (0,36 a 0,49, média de 0,44) utilizando 12 combinações AFLP para analisar 72 variedades indianas de soja. Alwala et al. (2006), em um estudo em cana-de-açúcar, comparou marcadores AFLP e TRAP e também obteve valores de PIC (0,35 e 0,36) e proporção de marcas polimórficas (53 e 55%) semelhantes entre estes marcadores, comprovando a eficácia e informatividade de ambos.

O marcador AFLP é amplamente conhecido pela sua capacidade em amplificar simultaneamente vários locos distribuídos aleatoriamente no genoma. Entretanto, o aumento do número de sequências de genes disponíveis em bancos de dados faz do marcador TRAP uma ferramenta muito importante. Apesar de apresentar uma eficiência menor na amplificação de locos em relação ao AFLP, o TRAP permite a detecção de polimorfismo em regiões próximas a genes de interesse, o que o torna vantajoso em estudos para identificação de QTLs, por exemplo, acelerando o processo de seleção assistida por marcadores (SAM).

4.4 Construção do mapa genético

O padrão de segregação de cada marcador foi analisado através do teste do χ^2 , com um valor de $\alpha^*=0,00051$, segundo correção de Bonferroni. Porém, mesmo os marcadores que apresentaram desvio na segregação foram utilizados para o mapeamento, como defendido por alguns autores (XU, 2008). A ausência do padrão

mendeliano é denominado distorção da segregação mendeliana e pode ser resultado de uma viabilidade diferencial dos gametas, como constatado por autores que utilizaram marcadores com desvio de segregação no mapeamento de maçã (CONNER; BROWN; WEEDEN, 1997) e cebola (HEUSDEN et al., 2000). Entre os marcadores que apresentaram desvios de segregação após a correção de Bonferroni, foram encontrados 21 marcadores AFLP e 13 marcadores TRAP, representando 34,69% do total de marcadores. Caso não fosse realizada a correção, a segregação de 31 marcadores AFLP e 16 TRAP seria considerada desviante, representando 47,95% do total de marcadores. Para a construção do mapa genético foram utilizados 67 marcadores AFLP e 31 marcadores TRAP perfazendo um total de 98 marcadores (ANEXO B).

A análise de ligação dos marcadores resultou em um mapa com 12 grupos de ligação (GL) (Figura 11) contendo 68 marcadores sendo que 49 marcadores foram alocados aos grupos de ligação e 19 marcadores ficaram como acessórios (Tabela 13). Os marcadores acessórios foram posicionados de acordo com a menor distância em relação a outro marcador alocado no *framework* de cada grupo de ligação. O comprimento total do mapa foi de 696 cM, sendo o GL11 o que apresentou menor comprimento (7,7 cM) e o GL5 maior comprimento (204 cM) (Tabela 14). O número de marcadores por GL variou de dois a 12 e a distância entre marcadores foi de 3,7 cM (T8 - A27) a 190 cM (A31 - A32 e T13 - T14), com distância média de 17,93 cM. Considerando o número de cromossomos da espécie seria esperado a obtenção de 20 grupos de ligação no mapa. Para isso, o uso de uma maior quantidade de marcadores se faz necessário, assim como a utilização de marcadores co-dominantes para integrar os marcadores que ficaram como acessórios do *frame* dos grupos de ligação e os marcadores que não foram ligados a nenhum grupo. Todos os marcadores do GL5 apresentaram desvio de segregação mesmo após a correção de Bonferroni. Provavelmente essa distorção não está associada a erro de genotipagem, mas pode estar relacionada a algum fenômeno de seleção gamética. Para todos estes marcadores do GL5 o genitor CD-215 é dominante em relação ao genitor IAC-100, indicando que a inviabilidade do gameta F_1 deve ser embrionária. A concentração de marcadores apresentando desvio de segregação em um mesmo GL também foi

observada por Lima (2010) que utilizou marcadores AFLP, TRAP e microssatélites (SSR) na construção de um mapa em eucalipto. O autor inferiu que provavelmente há uma correlação entre os marcadores que apresentaram desvio e genes letais que impedem que alguns dos genótipos sobrevivam, em etapas embrionárias ou subsequentes.

Figura 11 - Mapa genético da população F₂ oriunda do cruzamento entre IAC-100 e CD-215. À direita, a letra A refere-se aos marcadores AFLP e a letra T aos marcadores TRAP. À esquerda as distâncias entre os marcadores em centiMorgans utilizando função de mapeamento de Kosambi. Os marcadores acessórios e suas respectivas distâncias encontram-se sublinhados

Tabela 13 - Número de marcadores genotipados, número e percentagem de marcadores alocados, acessórios e não ligados para o AFLP e TRAP

Marcador	Nº marcadores genotipados	Marcadores		
		alocados	acessórios	não ligados
AFLP	67	35 (52,24%)	15 (22,39%)	17 (25,37%)
TRAP	31	14 (45,16%)	4 (12,90%)	13 (41,94%)
Total	98	49	19	30

Tabela 14 - Número de marcadores alocados, acessórios e total para os 12 grupos de ligação, tamanho (cM) de cada GL e distância média entre os marcadores alocados em cada GL

Grupo de Ligação	Marcadores			Tamanho GL (cM)	Distância média (cM)
	Alocados	Acessórios	Total		
GL1	6	3	9	110,4	22,1
GL2	8	4	12	84,9	12,1
GL3	5	2	7	97,8	24,5
GL4	2	0	2	24,3	24,3
GL5	10	1	11	204,0	22,7
GL6	4	4	8	49,0	16,3
GL7	2	1	3	7,0	7,0
GL8	3	2	5	40,3	20,2
GL9	2	0	2	13,6	13,6
GL10	3	1	4	24,6	12,3
GL11	2	0	2	7,7	7,7
GL12	2	1	3	32,4	32,4
Total				696	Média 17,93

4.5 Mapeamento de QTLs

Apesar de alguns dados fenotípicos não terem apresentado distribuição normal, foram utilizados os dados originais, sem transformação, para o mapeamento dos QTLs.

4.5.1 Mapeamento por marcas simples

A análise por marcas simples, utilizando LOD=2,5, detectou marcadores ligados a QTLs para os 15 caracteres avaliados. Entretanto, após correção de Bonferroni foram observados valores significativos a 5% ($p \leq 0,001$) para três QTLs referentes ao NDM,

PEG e IPDV e valores significativos a 10% ($p \leq 0,002$) para seis QTLs referentes ao NDM, APM, PEG, RF (dois QTLs) e IPDV (Figuras 12 a 16 e Tabelas 15 a 19). Considerando a metodologia utilizada nesta análise pode-se concluir que se trata de uma abordagem inicial para detecção dos QTLs, pois não há precisão na estimação do efeito e da posição dos mesmos.

Número de dias para a maturidade

Figura 12 - Análise de QTL referente ao NDM pelo método de marcas simples mostrando os 12 GL e a presença de um QTL (*) significativo a 5% e a 10% após a correção de Bonferroni no GL1

Tabela 15 - Grupo de ligação e posição do QTL referente ao NDM, média do caráter (b_0), aumento do caráter (b_1) e p-valor de F

GL	Posição	Marcador	b_0	b_1	$(-2\ln)(L_0/L_1)$	$F(1,n-2)$	$pr(F)$
1	6	T2	104,648	1,086	10,523	10,644	0,001**

** significativo a 5% e a 10%

Altura da planta na maturidade

Figura 13 - Análise de QTL referente à APM pelo método de marcas simples mostrando os 12 GL e a presença de um QTL (*) significativo a 10% após a correção de Bonferroni no GL2

Tabela 16 - Grupo de ligação e posição do QTL referente à APM, média do caráter (b_0), aumento do caráter (b_1) e p-valor de F

GL	Posição	Marcador	b_0	b_1	$(-2\ln)(L_0/L_1)$	$F(1,n-2)$	$pr(F)$
2	8	T11	69,570	-4,038	9,933	10,037	0,002*

* significativo a 10%

Período de enchimento dos grãos

PEG

Figura 14 - Análise de QTL referente ao PEG pelo método de marcas simples mostrando os 12 GL e a presença de um QTL (*) significativo a 5% e a 10% após a correção de Bonferroni no GL5

Tabela 17 - Grupo de ligação e posição do QTL referente ao PEG, média do caráter (b_0), aumento do caráter (b_1) e p-valor de F

GL	Posição	Marcador	b_0	b_1	$(-2\ln)(L_0/L_1)$	$F(1,n-2)$	$pr(F)$
5	3	T10	13,365	1,142	15,082	15,378	0,000**

** significativo a 5% e a 10%

Retenção foliar

RF

Figura 15 - Análise de QTL referente à RF pelo método de marcas simples mostrando os 12 GL e a presença de dois QTLs significativos a 10% após a correção de Bonferroni, ambos no GL3

Tabela 18 - Grupo de ligação e posição do QTL referente à RF, média do caráter (b_0), aumento do caráter (b_1) e p-valor de F.

GL	Posição	Marcador	b_0	b_1	$(-2\ln)(L_0/L_1)$	$F(1,n-2)$	$pr(F)$
3	4	A18	1,646	0,267	9,589	9,684	0,002*
3	5	A16	1,621	0,272	9,647	9,742	0,002*

* significativo a 10%

Índice percentual de danos nas vagens

IPDV

Figura 16 - Análise de QTL referente ao IPDV pelo método de marcas simples mostrando os 12 GL e a presença de um QTL significativo a 5% e a 10% após a correção de Bonferroni no GL3

Tabela 19 - Grupo de ligação e posição do QTL referente ao IPDV, média do caráter (b_0), aumento do caráter (b_1) e p-valor de F.

GL	Posição	Marcador	b_0	b_1	$(-2\ln)(L_0/L_1)$	$F(1,n-2)$	$pr(F)$
3	2	A38	15,52	-3,02	10,896	11,029	0,001**

** significativo a 5% e a 10%

4.5.2 Mapeamento por intervalo composto

O mapeamento por intervalo composto identificou 14 QTLs referentes a cinco caracteres, sendo eles: APF, VA, PG, NSM (oito QTLs) e PSB (três QTLs). Os valores críticos considerados para cada um dos caracteres foram: APF (LOD=3,05), VA (LOD=3,80), PG (LOD=4,97), NSM (LOD=6,35) e PSB (LOD=4,20), considerando 5% de significância.

Altura da planta no florescimento (APF)

Para a altura da planta no florescimento foi detectado um QTL, no grupo de ligação 2, próximo ao marcador A59 (Figura 17 e Tabela 20). A proporção da variação fenotípica explicada por este QTL foi de 8,94%.

Figura 17 - Mapeamento de QTL pelo método CIM referente à APF. À esquerda o GL e à direita a representação gráfica dos valores de LOD. O valor crítico do LOD foi 3,05

Tabela 20 - QTL, grupo de ligação, marcador mais próximo, distância em centiMorgan, razão de verossimilhança ($H_0:H_3$) e percentagem fenotípica explicada pelo QTL (R^2)

QTL	GL	Marcador	Distância (cM)	$H_0:H_3$	R^2 (%)
APF	2	A59	36,24	14,238	8,94

Valor agronômico (VA)

Para o valor agronômico foi detectado um QTL, no grupo de ligação 8, próximo ao marcador A46 (Figura 18 e Tabela 21). A proporção da variação fenotípica explicada por este QTL foi de 35,86%.

Figura 18 - Mapeamento de QTL pelo método CIM referente ao VA. À esquerda o GL e à direita a representação gráfica dos valores de LOD. O valor crítico do LOD foi 3,80

Tabela 21 - QTL, grupo de ligação, marcador mais próximo, distância em centiMorgan, razão de verossimilhança ($H_0:H_3$) e percentagem fenotípica explicada pelo QTL (R^2)

QTL	GL	Marcador	Distância (cM)	$H_0:H_3$	R^2 (%)
VA	8	A46	37,13	20,530	35,86

Produtividade (PG)

Para produtividade foi detectado um QTL, localizado no grupo de ligação 11, próximo ao marcador T1 (Figura 19 e Tabela 22). A proporção da variação fenotípica explicada por este QTL foi de 48,05%.

Figura 19 - Mapeamento de QTL pelo método CIM referente à PG. À esquerda o GL e à direita a representação gráfica dos valores de LOD. O valor crítico do LOD foi 4,97

Tabela 22 - QTL, grupo de ligação, marcador mais próximo, distância em centiMorgan, razão de verossimilhança ($H_0:H_3$) e percentagem fenotípica explicada pelo QTL (R^2)

QTL	GL	Marcador	Distância (cM)	$H_0:H_3$	R^2 (%)
PG	11	T1	2,01	26,089	48,05

Número de sementes manchadas (NSM)

Foram detectados oito QTLs, distribuídos por cinco grupos de ligação, para número de sementes manchadas (Figura 20 e Tabela 23). A proporção da variação fenotípica explicada por estes QTLs variou de 45,34% (GL 2) até 59,97% (GL 1).

Figura 20 - Mapeamento de QTLs pelo método CIM referente ao NSM. À esquerda os GLs e à direita as representações gráficas dos valores de LOD. O valor crítico do LOD foi 6,35

Tabela 23 - QTL, grupo de ligação, marcador mais próximo, distância em centiMorgan, razão de verossimilhança ($H_0:H_3$) e percentagem fenotípica explicada pelo QTL (R^2)

QTL	GL	Marcador	Distância (cM)	$H_0:H_3$	R^2 (%)	QTL	GL	Marcador	Distância (cM)	$H_0:H_3$	R^2 (%)
NSM_1	1	A6	80,89	50,009	59,97	NSM_5	5	A35	162,49	92,919	50,26
NSM_2	2	A45	8,01	35,358	46,62	NSM_6	5	T18	173,07	89,759	50,93
NSM_3	2	T5	71,56	79,377	45,34	NSM_7	6	A63	48,16	33,139	53,93
NSM_4	5	T28	110,05	75,712	54,56	NSM_8	7	A20	6,01	66,766	58,80

Peso de sementes boas (PSB)

Foram detectados três QTLs, distribuídos por três grupos de ligação, para peso de sementes boas (Figura 21 e Tabela 24). A proporção da variação fenotípica explicada por estes QTLs variou de 28,56 (GL 3) até 47,32% (GL 11).

Um dos QTLs referente ao peso de sementes boas foi mapeado na mesma posição genômica que o QTL referente à produtividade, no grupo de ligação 11, próximo ao marcador T1. Como este GL não está saturado, apresentando apenas dois marcadores com distância de 7,7 cM entre eles, não é possível inferir se há a presença de pleiotropia, ou seja, um QTL controlando estas duas características ou se existem QTLs distintos para cada característica.

Tabela 24 - QTL, grupo de ligação, marcador mais próximo, distância em centiMorgan, razão de verossimilhança ($H_0:H_3$) e percentagem fenotípica explicada pelo QTL (R^2)

QTL	GL	Marcador	Distância (cM)	$H_0:H_3$	R^2 (%)
PSB_1	1	A50	102,09	20,528	42,85
PSB_2	3	A7	0,01	20,181	28,56
PSB_3	11	T1	7,01	31,976	47,32

Figura 21 - Mapeamento de QTLs pelo método CIM referente ao PSB. À esquerda os GLs e à direita as representações gráficas dos valores de LOD. O valor crítico do LOD foi 4,20

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultivar IAC-100 apresentou um menor período de enchimento dos grãos, como relatado em literatura, considerado como um caso de evasão hospedeira pois a planta passa mais rapidamente pelo período de maior suscetibilidade aos percevejos sugadores das vagens. A cultivar CD-215, selecionada como genitor suscetível ao complexo de percevejos, apresentou um mecanismo de mitigação dos danos causados por percevejos nas sementes, resultando em um maior número de vagens em relação ao IAC-100 e, portanto, demonstrou melhor desempenho para os caracteres valor agrônômico (VA), número de vagens por planta (NVP), produtividade (PG), índice percentual de danos nas vagens (IPDV) e peso de sementes boas (PSB), mostrando-se uma cultivar que pode ser recomendada para cruzamentos visando a obtenção de genótipos resistentes aos percevejos. O aumento populacional dos percevejos foi significativo no período de enchimento de grãos, ocasionando reduções tanto na qualidade das sementes quanto na produtividade das plantas. A infestação natural observada garantiu uma boa avaliação da reação dos genótipos quanto ao ataque de percevejos.

Os marcadores AFLP apresentaram um maior índice de eficiência em relação aos marcadores TRAP o que é resultado de uma maior amplificação de bandas por combinação. Os marcadores TRAP, por sua vez, apresentaram uma maior proporção de marcas polimórficas em relação aos marcadores AFLP pelo fato de amplificarem um menor número de marcas. O valor médio do PIC foi semelhante para esses marcadores, mostrando que ambos foram eficientes na distinção dos indivíduos da população F_2 . Os marcadores SNP apresentaram polimorfismo não informativo, sendo portanto descartados na construção do mapa genético. Todos os marcadores AFLP e TRAP foram utilizados na construção do mapa genético, mesmo os que apresentaram desvio na segregação, pois, como já discutido, a distorção pode estar relacionada a um fenômeno de seleção gamética. Todos os marcadores do GL5 apresentaram desvio de segregação e banda proveniente do genitor CD-215 evidenciando uma possível seleção pré-zigótica. Os dados fenotípicos utilizados para o mapeamento dos QTLs foram os originais, sem transformação. A construção do mapa genético foi prejudicada pela utilização exclusiva de marcadores dominantes. A inclusão de marcadores co-

dominantes se faz necessária para se ampliar a cobertura do genoma da soja permitindo a localização das marcas no mapa, e assim identificar aquelas mais próximas aos QTLs envolvidos na resistência da soja ao complexo de percevejos.

Verifica-se que o número de marcadores não foi suficiente para realizar uma cobertura satisfatória do genoma, fato que prejudicou a identificação de QTLs, principalmente quando se realizou o mapeamento por intervalo composto, devido a distância entre estes marcadores no mapa de ligação. Contudo, constata-se que a metodologia utilizada neste estudo foi satisfatória e garantiu a qualidade dos resultados obtidos, mesmo com um número reduzido de marcadores e de natureza dominante.

O mapeamento de QTLs associados a resistência da soja ao complexo de percevejos, realizado neste trabalho, é inédito no mundo e representa apenas a etapa inicial de estudos mais detalhados para a identificação de marcadores fortemente ligados e também a localização de outras regiões do genoma envolvidas no controle desta resistência.

6 CONCLUSÕES

A população F_2 sintetizada para o mapeamento apresentou segregação para os caracteres avaliados permitindo a detecção de QTLs.

O mapeamento por marcas simples permitiu a detecção de seis QTLs referentes aos caracteres: número de dias para a maturidade (NDM), altura da planta na maturidade (APM), período de enchimento dos grãos (PEG), retenção foliar (RF) (dois QTLs) e índice percentual de danos nas vagens (IPDV).

O mapeamento por intervalo composto permitiu a detecção de 14 QTLs, referentes aos caracteres: altura da planta no florescimento (APF), valor agrônômico (VA), produtividade (PG), número de sementes manchadas (NSM) (oito QTLs) e peso de sementes boas (PSB) (três QTLs).

REFERÊNCIAS

- ALWALA, S.; KIMBENG, C.A.; GRAVOIS, K.A.; BISCHOFF, K.P. Trap, a new tool for sugarcane breeding: comparison with AFLP and coefficient of parentage. **Journal American Society Sugar Cane Technologists**, Florida, v. 26, p. 62-86, 2006.
- ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES E COMERCIANTES DE SEMENTES E MUDAS DO RS - APASSUL. Disponível em: <<http://www.apassul.com.br>>. Acesso em: 20 jan. 2009.
- BERLOTTE, L.C.; RAMIRO, Z.A.; FARIA, A.M.; MARINO, C.A.B. Danos causados por percevejos (Hemiptera: Pentatomidae) em cinco cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill, 1917) no município de Araçatuba, SP. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 169-175, 2003.
- BHATTRAMAKKI, D.; DOLAN, M.; HANAFEY, M.; WINELARD, R.; VASKE, D.; REGISTER, J.C. Insertion-deletion polymorphisms in 3' regions of maize genes occur frequently and can be used as highly informative genetic markers. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 48, p. 539-547, 2002.
- BOERMA, H.R.; WALKER, D.R. Discovery and utilization of QTLs for insect resistance in soybean. **Genetica**, Dordrecht, v. 123, p. 181-189, 2005.
- BOETHEL, D.J. Assessment of soybean germplasm for multiple insect resistance. In: CLEMENT, S.L.; QUISENBERRY, S.S. **Global Plant Genetic Resources for Insect-Resistant Crops**. Boca Raton: CRC Press, 1999. p. 101-129.
- BOETHEL, D.J.; RUSSIN, J.S.; WIER, A.T.; LAYTON, M.B.; MINK, J.S.; BOYD, M.L. Delayed maturity associated with southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) injury at various soybean phenological stages. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, p. 707-712, 2000.
- BRIER, H.; ROGERS, J. Susceptibility of soybean to damage by *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae) and *Riptortus serripes* (F.) (Hemiptera: Alydidae) during three stage of pod development. **Journal of Australian Entomological Society**, Brisbane, v. 30, p. 123-128, 1991.
- BUNKER, T.W.; KOETJE, D.S.; STEPHENSON, L.S.; CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E.; GRIMES, H. D. Sink limitation induces the expression of multiple soybean vegetative lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 7, p. 1319-1331, 1995.
- CARRAO-PANIZZI, M. C.; KITAMURA, K. Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. **Breeding Science**, Tokyo, v. 45, p. 295-300, 1995.

CHEN, J.; HU, J.; VICK, B.A.; JAN, C.C. Molecular mapping of a nuclear male-sterility gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using TRAP and SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 113, p. 122-127, 2006.

CHING, A.; CALDWELL, K.S.; JUNG, M.; DOLAN, M.; SMITH, O.S. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. **BMC Genetics**, London, v. 3, p. 19, 2002.

CHOI, I.Y.; HYTEN, D.L.; MATUKUMALLI, K.L.; SONG, Q.; CHAKY, M.J.; QUIGLEY, V.C.; CHASE, K.; LARK, G.K.; REITER, S.R.; YOON, M.S.; HWANG, E.Y.; YI, S.I.; YOUNG, N.D.; SHOEMAKER, R.C.; VAN, T.C.P.; SPECHT, J.E.; CREGAN, P.B. A soybean transcript map: gene distribution, haplotype and single-nucleotide polymorphism analysis. **Genetics**, Pittsburgh, v. 176, p. 685-696, 2007.

CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, Pittsburgh, v. 138, p. 963-971, 1994.

CIVIDANES, F.J.; PARRA, J.R.P. Zoneamento ecológico de *Nezara viridula* (L.), *Piezodorus guildinii* (West.) e *Euschistus heros* (Fabr.) (Heteroptera: Pentatomidae) em quatro estados produtores de soja do Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 23, p. 219-226, 1994.

COELHO, A.S.G. Considerações gerais sobre a análise de QTL. In: PINHEIRO, J.B.; CARNEIRO, I.F. (Ed.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000. p. 1-20.

COELHO, A.S.G. TreeMap – *Software* para construção de mapas genéticos em cruzamentos derivados de genótipos não-endogâmicos. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO, 2005.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 5 fev. 2009.

CONNER, P.J.; BROWN, S.K.; WEEDEN, N.F. Randomly amplified polymorphic DNA-based genetic linkage maps of three apple cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 122, n. 3, p. 350-359, 1997.

COOPERATIVA CENTRAL AGROPECUÁRIA DE DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E ECONÔMICO LTDA - COODETEC. Disponível em: <<http://www.coodetec.com.br>>. Acesso em: 20 jan. 2009.

CORRÊA-FERREIRA, B.S.; PANIZZI, A.R. **Percevejo da soja e seu manejo**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1999, 45 p. Circular Técnica, 24.

CORRÊA-FERREIRA, B.S.; AZEVEDO, J. Soybean seed damage by different species of stink bugs. **Agriculture and Forest Entomology**, Midlothian, v. 4, p. 145-150, 2002.

CORRÊA-FERREIRA, B.S.; PERES, W.A.A. Comportamento da população dos percevejos-pragas e a fenologia da soja. In: CORRÊA-FERREIRA, B.S. (Org.) **Soja orgânica: alternativas para o manejo dos insetos-pragas**. Londrina: Embrapa Soja, 2003. cap. 3, p. 27-32.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 19. p. 299-306, 2001.

DAUGHERTY, D.M.; NEUSTADT, M.H.; GEHRKE, C.W.; CAVANAH, L.E.; WILLIAMS, L.F.; GREEN, D.E. An evaluation of damage to soybeans by brown and green stink bugs. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 57, n. 10, p.719-722, 1964.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA fresh tissue, **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13-15, 1990.

EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize: numbers, genomic distribution and types of gene action. **Genetics**, Pittsburgh, v. 116, p. 113-125, 1987.

EULGEM, T.; RUSHTON, P.J.; SCHMELZER, E.; HAHLBROCK, K.; SOMSSICH, I.E. Early nuclear events in plant defence signaling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. **European Molecular Biology Organization**, Heidelberg, v. 18, p. 4689-4699, 1999.

EULGEM, T.; RUSHTON, P.J.; ROBATZEK, S.; SOMSSICH, I.E. The WRKY superfamily of plant transcription factors. **Trends in plant science**, London, v. 5, n. 5, 2000.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Use of molecular markers to accelerate the breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose. **Euphytica**, Dordrecht, v. 138, n. 3, p. 213-218, 2004.

FAO. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 20 maio 2009.

FIDANTSEF, A.L.; STOUTH, M. J.; THALER, J. S.; DUFFEY, S. S.; BOSTOCK, R. M. Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 54, p. 97-114, 1999.

GAO, G.R.; CASTELO, A.T.; MARTINS, W. TROLL – Tandem Repeat Occurrence Locator. **Bioinformatics**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 634-636, 2002.

GAZZONI, D.L. Efeito de populações de percevejos na produtividade, qualidade da semente e características agrônômicas da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 8, p. 1229-1237, 1998.

GAZZONI, D.L.; MOSCARDI, F. Effect of defoliation levels on recovery of leaf area, on yield and agronomic traits of soybeans. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 411-424, 1998.

GELDERMANN, H. Investigations of inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 46, n. 7, p. 319-330, 1975.

GODOI, C.R.C.; PINHEIRO, J.B. Genetic parameters and selection strategies of soybean genotypes resistant to stink bug-complex. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 32, p. 328-336, 2009.

HEUSDEN, A.W. van; OOIJEN, J.W. van; GINKEL, R.V. van; VERBEEK, W.H.J.; WIETSMA, W.A.; KIK, C. A genetic map of an interspecific cross in *Allium* based on amplified fragment length polymorphism (AFLP (TM)) markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 100, n. 1, p. 118-126, 2000.

HU, J.; VICK, B.A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 21, p. 289-294, 2003.

HYTEN, D.L.; SMITH, J.R.; FREDERICK, R.D.; TUCKER, M.L.; SONG, Q.; CREGAN, P.B. Bulked segregant analysis using the GoldenGate assay to locate the *Rpp3* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 49, p. 265-271, 2009.

HYTEN, D.L.; CHOI, I-Y.; SONG, Q.; SPECHT, J.E.; CARTER, T.E.Jr.; SHOEMAKER, R.C.; HWANG, E-Y.; MATUKUMALLI, L.K.; CREGAN, P.B. A high density integrated genetic linkage map of soybean and the development of a 1536 universal soy linkage panel for quantitative trait locus mapping. **Crop Science**, Madison, v. 50, p. 960, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home>>. Acesso em: 21 abr. 2009.

JONES, W.A.Jr.; SULLIVAN, M.J. Susceptibility of certain soybean cultivars to damage by stink bugs. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 71, n. 3, p. 534-536, 1978.

JULIER, B.; FLAJOULOT, S.; BARRE, P.; CARDINET, G.; SANTONI, S.; HUGUET, T.; HUYGHE, C. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. **Plant Biology**, London, v. 3, n. 9, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC324403/pdf/1471-2229-3-9.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2009.

KACZOROWSKI, K.A.; KIM, K.S.; DIERS, B.W.; HUDSON, M.E. Microarray-based genetic mapping using soybean near-isogenic lines and generation of SNP markers in the *Rag1* aphid-resistance interval. **The Plant Genome**, Madison, v. 1, n. 2, p. 89-98, 2008. Disponível em: <<http://plantgenome.scijournals.org>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

KOGAN, M.; ORTMAN, E.E. Antixenosis – a new term proposed to define Painter's 'nonpreference' modality of resistance. **Bulletin of the Entomological Society of America**, Lanhan, v. 24, p. 175-176, 1978.

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distances from recombination values. **Annual Eugenics**, London, v. 12, p. 172-175, 1944.

KWOK, P.Y.; GU, Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? **Molecular Medicine Today**, London, v. 5, n. 12, p. 538-543, 1999.

LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, Pittsburgh, v. 121, p. 185-199, 1987.

LIANG, F.; DENG, Q.; WANG, Y.; XIONG, Y.; JIN, D.; LI, J.; WANG, B. Molecular marker-assisted selection for yield-enhancing genes in the progeny of "9311" X *O. rufipogon* using SSR. **Euphytica**, Dordrecht, v. 139, n. 2, p. 159-165, 2004.

LIMA, B.M. **Mapeamento de locos de resistência quantitativa a *Puccinia psidii* Winter em uma progênie de irmãos completos de eucalipto**. 2010. 63 p. Dissertação de mestrado (Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

LIU, B.H. **Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 611 p.

LIU, Z.H.; ANDERSON, J.A.; HU, J.; FRIESEN, T.L.; RASMUSSEN, J.B.; FARIS, J.D. A wheat intervarietal genetic linkage map based on microsatellite and target region amplified polymorphism markers and its utility for detecting quantitative trait loci. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 111, p. 782-794, 2005.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; CARNEIRO, M.S.; MATTA, F.P.; CAMARGO, L.E.A.; VIEIRA, M.L.C. AFLP linkage analysis and mapping of resistance genes to *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in yellow fruit. **Genome**, Ottawa, v. 49, p. 17-29, 2006.

LU, A.X.; SOSINSKI, B.; REIGHARD, G.L.; BAIRD, W.V.; ABBOTT, A.G. Construction of a genetic linkage map and identification of AFLP markers for resistance to root-knot nematodes in peach rootstocks. **Genome**, Ottawa, v. 41, p. 199-207, 1998.

LUSTOSA, P.R.; ZANUNCIO, J.C.; LEITE, G.L.D.; PICANÇO, M. Qualidade da semente e senescência de genótipos de soja sob dois níveis de infestação de percevejos (PENTATOMIDAE). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 8: 1347-1351, 1999.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Massachusetts: Sinauer Sunderland, 1998. 980 p.

MAGRINI, E.A.; SILVEIRA NETO, S.; BOTELHO, P.S.M; NEGRIM, S.G. Ocorrência de percevejos no município de Pirassununga-SP, associada com a fenologia da soja. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 71, p. 187-193, 1996.

MAHESWARAN, M.; SUBUDHI, P.K.; NANDI, S.; XU, J.C.; PARCO, A.; YANG, D.C.; HUANG, N. Polymorphism, distribution and segregation of AFLP markers in a doubled haploid rice population. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 94, p. 39-45, 1997.

McPHERSON, R. M.; BUSS, G.R. Evaluating lepidopteran defoliation resistance in soybean breeding lines containing the stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) resistance IAC-100 cultivar in their pedigrees. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, n. 3, p. 962-968, 2007.

McPHERSON, R.M.; BUSS, G.R.; ROBERTS, P.M. Assessing stink bug resistance in soybean breeding lines containing genes from germplasm IAC-100. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, n. 4, p. 1456-1463, 2007.

MENG, X.; RUBIN, D.B. Maximum likelihood estimation via ECM algorithm: A general framework. **Biometrika**, Nova York, v. 80, p. 267-268, 1993.

MERRIL, C.R.; GOLDMAN, D.; SEDMAN, S.A.; EBERT, M.H. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. **Science**, Washington, v. 211, p. 1437-1438, 1981.

MIKLAS, P.N.; HU, J.; GRÜNWALD, N.J.; LARSEN, K.M. Potential application of TRAP (target region amplification polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 910-916, 2006.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR – SECRETARIA DE COMÉRCIO EXTERIOR - SECEX. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/secex>>. Acesso em: 19 jan. 2009.

MIRANDA, M.A.C.; BRAGA, N.R.; MIRANDA, F.T.S.; UNEDA, S.H.; LOURENÇO, A.L.; ITO, M.F. IAC-23 e IAC-24: cultivares de soja resistentes a insetos para o estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: SBMP, 2001. p. 12.

MIRANDA, M.A.C.; LOURENÇÃO, A.L. Melhoramento genético da soja para a resistência a insetos: uma realidade para aumentar a eficiência do controle integrado de pragas e viabilizar a soja orgânica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA E MERCOSOJA, 2., 2002, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa-Soja, 2002. p. 52-60.

MOREAU, L.; CHARCOSSET, A.; GALLAIS, A. Experimental evaluation of several cycles of marker-assisted selection in maize. **Euphytica**, Dordrecht, v. 137, n. 1, p. 11-118, 2004.

MOURA, M.F. **Avaliação de linhagens de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) visando adaptação às condições de cerrado e resistência a insetos.** 1999. 156p. Dissertação de mestrado - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, 1999.

MULATO, B.M. **Diversidade genética em germoplasma de soja identificada por marcadores SSR, EST-SSR e caracteres agromorfológicos.** 2009. 86p. Dissertação de mestrado (Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MULATO, B.M.; MÖLLER, M.; ZUCCHI, M.I.; QUECINI, V.; PINHEIRO, J.B. Genetic diversity in soybean germplasm identified by SSR and EST-SSR markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 3, p. 276-283, 2010.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, TAXONOMY - NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=3847>> Acesso em: 05 Abr. 2010.

PAINTER, R.H. Insect resistance in crop plants. Lawrence: The University Press of Kansas, 1951. 520 p.

PANIZZI, A.R.; SMITH, J.G.; PEREIRA, L.A.G.; YAMASITA, J. Efeitos dos danos de *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) no rendimento e qualidade da soja. In: I SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 1979, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa CNP-So, 1979. v. 2, p. 59-78.

PANIZZI, A.R.; SLANSKY JÚNIOR, F. Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 68, p. 184-214, 1985.

PANIZZI, A.R.; PANIZZI, M.C.C.; BAYS, I.A.; ALMEIDA, L.A. Danos por percevejos em genótipos de soja com semente pequena. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 6, p. 571-577, 1986.

PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P.; SANTOS, C.H.; CARVALHO, D.R. Rearing the southern green stink bug using artificial dry diet and artificial plant. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 9, p. 1709-1715, 2000.

PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M.; KOZUMPLICK, V.; CASTIGLIONI, P.; TARAMINO, G.; MOTTO, M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p. 1248-1255, 1998.

PINHEIRO, J.B. **Dialelo parcial entre parentais de soja resistentes e suscetíveis a insetos**. 1993. 143 p. Dissertação de mestrado (Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

PINHEIRO, J.B.; VELLO, N.A.; ROSSETTO, C.J.; ZUCCHI, M.I. Potential of soybean genotypes as insect resistance sources. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 5, p. 294-301, 2005.

QI, X.; STAM, P.; LINHOUT, P. Use of lócus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, p. 376-384, 1998.

RAFALSKI, J.A.; VOGEL, J.M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S.V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E. (Eds.) **Non mammalian Genome Analysis**. Boston: Academic Press, 1996. p. 75-134.

RECTOR, B.G.; ALL, J.N.; PARROTT, W.A.; BOERMA, H.R. Identification of molecular markers linked to quantitative trait loci for soybean resistance to corn earworm. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, p. 786-790, 1998.

RECTOR, B.G.; ALL, J.N.; PARROTT, W.A.; BOERMA, H.R. Quantitative trait loci for antixenosis resistance to corn earworm in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 531-538, 1999.

RECTOR, B.G.; ALL, J.N.; PARROTT, W.A.; BOERMA, H.R. Quantitative trait loci for antibiosis resistance to corn earworm in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 233-238, 2000.

ROSSETTO, C. J. Breeding for resistance to stink bugs, In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4., 1989, Buenos Aires. **Proceedings...** Buenos Aires: Asociacion Argentina de la Soja Press, 1989. v. 4, p. 2046-2060.

ROSSETTO, C.J.; TISELLI FILHO, O.; RAZERA, L.F.; GALLO, P.B.; PEDRO JÚNIOR, M.J.; CAMARGO, M.B.P.; IGUE, T.; TEIXEIRA, J.P.F. Integration of resistance cultivar and date of plant for cultivation of soybean with reduced used of inseticides. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4., 1989, Buenos Aires. **Proceedings...** Buenos Aires: Association Argentina de la Soja Press, 1989. v. 4, p. 1582-1587.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, Nova York, v. 132, p. 365-386, 2000.

RYAN, C. A. Review. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1477, p. 112-121, 2000.

SATYAVATHI, C.T.; BHAT, K.V.; BHARADWAJ, C.; TIWARI, S.P.; CHAUDHURY, V.K. AFLP analysis of genetic diversity in Indian soybean [*Glycine max* (L.) Merr. Varieties. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 53, p. 1069-1079, 2006.

SCALLON, B.J.; DICKINSON, C.D.; NIELSEN, N.C. Characterization of a null-allele for the Gy4 glycinin gene from soybean. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 208, p. 107-113, 1987.

SCHMID, K.J.; SORENSEN, T.R.; STRACKE, R.; TORJEK, O.; ALTMANN, T. Large-scale identification and analysis of genomewide single-nucleotide polymorphisms for mapping in *Arabidopsis thaliana*. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 13, p. 1250-1257, 2003.

SHIBATA, D.; STECZKO, J.; DIXON, J. E.; HERMODSON, M.; YAZDANPARAST, R.; AXELROD, B. Primary structure of soybean lipoxigenase 1. **Journal of Biochemistry**, Bethesda, v. 262, p. 10080-10085, 1987.

SHIBATA, D.; STECZKO, J.; DIXON, J. E.; ANDREWS, P. C.; HERMODSON, M.; AXELROD, B. Primary structure of soybean lipoxigenase L-2. **Journal of Biochemistry**, Bethesda, v. 263, p. 6816-6821, 1988.

SOSA-GÓMEZ, D.; MOSCARDI, F. Retenção foliar diferencial em soja provocada por percevejos (Heteroptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 24, p. 401-404, 1995.

SOUZA, R.F.de; TOLEDO, J.F.F.de. Genetic analysis of soybean resistance to stink bug. **Revista Brasileira de Genética**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 593-598, 1995.

STUBER, C.W.; LINCOLN, S.E.; WOLFF, D.W.; HELENTJARIS, T.; LANDER, E.S. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. **Genetics**, Pittsburgh, v. 132, n. 3, p. 823-839, 1992.

TERRY, L.I.; CHASE, K.; JARVIK, T.; ORF, J.; MANSUR, L.; LARK, K.G. Soybean quantitative trait loci for resistance to insects. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 375-382, 2000.

THODAY, J.M. Location of polygenes. **Nature**, New York, v. 191, p. 368-370, 1961.

VEIGA, R.F.A.; ROSSETO, C.J.; RAZERA, L.F.; GALLO, P.B.; BORTOLETO, N.; MEDINA, P.F.; TISSELLI FILHO, O.; CIONE J. **Caracterização morfológica e agrônômica do cultivar de soja IAC-100**. São Paulo: Instituto Agrônômico de Campinas, 1999. 23 p. (Boletim Técnico, 177).

VENOFSKY, R. L.; FINE, M.; LIU, C. Isolation and characterization of soybean (*Glycine max*) lipoxygenase-3 gene. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 211, p. 215-222, 1988.

VENTURA, M.U.; PINHEIRO, J.B. Resistência a insetos. In: DESTRO, D.; MONTALVÁN, R. (Org.). **Melhoramento genético de plantas**. Londrina: UEL, 1999. p. 467-516.

VENZON, M; RIPPOSATI, J.G.; FERREIRA, J.A.M.; VIRÍSSIMO, J.H. Controle biológico de percevejos-da-soja no Triângulo Mineiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 1, p. 70-78, 1999.

VILLAS-BÔAS, G.L.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, M.C.N.de; COSTA, N.P.da; ROESSING, A.C.; FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. **Efeito de diferentes populações de percevejos sobre o rendimento e seus componentes, características agronômicas e qualidade de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1990. 43 p. (Boletim de Pesquisa, 1).

VOORRIPS, R.E. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **The Journal of Heredity**, Oxford, v. 93, n. 1, 2002. Disponível em: <http://jhered.oxfordjournals.org/cgi/reprint/93/1/77>. Acesso em: 20 maio 2010.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. van der; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

VUYLSTEKE, M.; MANK, R.; ANTONISE, R.; BASTIAANS, E.; SENIOR, M.L.; STUBER, C.W.; MELCHINGER, A.E.; LÜBBERSTEDT, T.; XIA, X.C.; STAM, P.; ZABEAU, M.; KUIPER, M. Two high-density AFLP linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, n. 6, p. 921-935, 1999.

WANG, S.; BASTEN, C.J.; ZENG, Z.B. **QTL Cartographer, Version 2.5**. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. 2010.

WELLER, J.I.; FERNANDO, R.L. Strategies for the improvement of animal production using marker-assisted selection. In: SCHOOK, L.B.; LEWIN, H.A.; McLAREN, D.G. (Eds.) **Gene mapping: strategies, techniques and applications**. New York: Marcel Decker, 1991. p. 305-328.

XU, B.; ZHEN, H.; LU, Q.; ZHAO, S. Three new evidences of the original area of soybean. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4., 1989, Buenos Aires. **Proceedings...** Buenos Aires: AASOJA, 1989, p. 123-130.

XU, S. Quantitative trait locus mapping can benefit from segregation distortion. **Genetics**, Pittsburgh, v. 180, p. 2201-2208, 2008.

XUE, Z. T.; XU, M.L.; SHEN, W.; ZHUANG, N.L.; HU, W.M. Characterization of a Gy4 glycinin gene from soybean *Glycine max* cv. Forrest. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 18, p. 897-908, 1992.

ZAKHAROVA, E.S.; EPISHIN, S.M.; VINETSKI, Y.P. An attempt to elucidate the origin of cultivated soybean via comparison of nucleotide sequences encoding glycinin B4 polypeptide of cultivated soybean, *Glycine max*, and its presumed wild progenitor, *Glycine soja*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 78, p. 852-856, 1989.

ZENG, J.W. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, Pittsburgh, v. 136, p. 1457-1468, 1994.

ZHI-WEI, Z.; ZHE-MING, C.; JING-SONG, Z.; TING-TING, W. Genetic structure analyses of different populations of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) using the TRAP technique. **Chinese Journal of Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 27-32, 2007.

ZHU, T.; SHI, L.; DOYLE, J.J.; KEIM, P. A single nuclear locus phylogeny of soybean based on DNA sequence. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, p. 991-999, 1995.

ZHU, Y.L.; SONG, Q.J.; HYTEN, D.L.; TASSELL, C.P. van; MATUKUMALLI, L.K. Single-nucleotide polymorphisms in soybean. **Genetics**, Pittsburgh, v. 163, p. 1123-1134, 2003.

ZHU, S.; WALKER, D.R.; BOERMA, H.R.; ALL, J.N.; PARROTT, W.A. Fine mapping of a major insect resistance QTL in soybean and its interaction with minor resistance QTLs. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 1094-1099, 2006.

ANEXOS


```

graph TD
    subgraph Left_Path [Left Path]
        Dunfield1[Dunfield] --- X1((X))
        X1 --- Haberlandt1[Haberlandt]
        X1 --- Illini1[Illini]
        Illini1 --- S1001[S100]
        S1001 --- X2((X))
        X2 --- Clemson1[Clemson]
        X2 --- CHS1[CHS]
        CHS1 --- Ilanking1[Ilanking]
        Ilanking1 --- Tokyo1[Tokyo]
        Tokyo1 --- X3((X))
        X3 --- PI8424[PI 8424 ou Ita mame]
        X3 --- D63215[D632 15]
        D63215 --- X4((X))
        X4 --- D492525[D49 2525]
        D492525 --- Hill1[Hill]
        Hill1 --- X5((X))
        X5 --- Roanoke1[Roanoke]
        Roanoke1 --- X6((X))
        X6 --- Ogden1[Ogden]
        Ogden1 --- D52810[D52 810]
        D52810 --- Paraná1[Paraná]
    end

    subgraph Right_Path [Right Path]
        PI36846[PI 36846] --- Dunfield2[Dunfield]
        Dunfield2 --- X7((X))
        X7 --- Haberlandt2[Haberlandt]
        X7 --- Illi3[Illi ou A.K. 3]
        Illi3 --- Clemson2[Clemson]
        Clemson2 --- CHS2[CHS]
        CHS2 --- S1002[S100]
        S1002 --- X8((X))
        X8 --- PI54610[PI 54 610]
        X8 --- D63215_2[D632 15]
        D63215_2 --- X9((X))
        X9 --- D492525_2[D49 2525]
        D492525_2 --- Hill2[Hill]
        Hill2 --- X10((X))
        X10 --- PI274454[PI274454]
        PI274454 --- IAC73231[IAC73 231]
    end

    Paraná1 --- X11((X))
    IAC73231 --- X11
    X11 --- IAC782318[IAC78 2318]
    X11 --- IAC12[IAC 12]
    IAC782318 --- X12((X))
    IAC12 --- X12
    X12 --- IAC100[IAC-100]
  
```

```

graph LR
    OC88-127 --- X
    X --- OC90-234
    X --- CD-215
    style X width:0px,height:0px
  
```

ANEXO B - Noventa e oito marcadores genotipados na população F_2 e utilizados no mapeamento

Marcador	GL	observação	Marcador	GL	observação
A1*	1		A50	1	
A2	1		A51	3	acessório
A3*	2	acessório	A52	9	
A4	1	acessório	A53	-	não ligado
A5	1	acessório	A54	6	
A6	1		A55	10	
A7*	3		A56	10	
A8	3	acessório	A57	9	
A9	4		A58	3	
A10*	4		A59*	2	
A11*	5	acessório	A60	6	
A12*	6	acessório	A61	-	não ligado
A13	6	acessório	A62	6	
A14*	5		A63	6	
A15	-	não ligado	A64	-	não ligado
A16	3		A65	-	não ligado
A17*	2		A66	-	não ligado
A18	3		A67	-	não ligado
A19	-	não ligado	T1	11	
A20	7		T2	1	
A21	7	acessório	T3	11	
A22	7		T4	-	não ligado
A23	1		T5*	2	
A24	-	não ligado	T6	-	não ligado
A25*	-	não ligado	T7	-	não ligado
A26	8		T8*	5	
A27*	5		T9	-	não ligado
A28	8		T10*	5	
A29	-	não ligado	T11*	2	
A30*	-	não ligado	T12*	5	
A31	-	não ligado	T13*	5	
A32	-	não ligado	T14	-	não ligado
A33	8	acessório	T15	-	não ligado
A34	-	não ligado	T16	-	não ligado
A35*	5		T17	10	acessório
A36*	2		T18*	5	
A37*	2	acessório	T19*	-	não ligado
A38*	3		T20	10	
A39*	5		T21	12	acessório
A40*	2		T22*	12	
A41*	2	acessório	T23	-	não ligado
A42*	2		T24	6	acessório
A43	6	acessório	T25*	2	acessório
A44		não ligado	T26	12	
A45*	2		T27	-	não ligado
A46	8		T28*	5	
A47	8	acessório	T29	-	não ligado
A48		não ligado	T30*	-	não ligado
A49	1	acessório	T31*	-	não ligado

* Marcadores com desvio de segregação após correção de Bonferroni