



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DORIVAL VICENTE

**MARCADORES MOLECULARES PARA OS GENES *Dt1* E  
*Dt2* E CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS EM SOJA  
ASSOCIADOS AO TIPO DE CRESCIMENTO DAS PLANTAS**

DORIVAL VICENTE

**MARCADORES MOLECULARES PARA OS GENES *Dt1* E  
*Dt2* E CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS EM SOJA  
ASSOCIADOS AO TIPO DE CRESCIMENTO DAS PLANTAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação  
em Agronomia da Universidade Estadual de  
Londrina, como requisito para obtenção do  
título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Cássio Egídio Cavenaghi  
Prete  
Coorientador: Prof. Dr. Ivan Schuster

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

V632m Vicente, Dorival.  
Marcadores moleculares para os genes *Dt1* e *Dt2* e características agronômicas em soja associados ao tipo de crescimento das plantas / Dorival Vicente - Londrina: UEL, 2013  
62 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Cássio Egídio Cavenaghi Prete  
Coorientador: Prof. Dr. Ivan Schuster

Tese (doutorado) Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2013.  
Inclui bibliografia

1. Genética molecular. 2. Marcadores genéticos. 3. Soja – Marcadores moleculares. I. Universidade Estadual de Londrina. Curso de Pós Graduação em Agronomia. II. Título.

CDU 631.52:633.34

DORIVAL VICENTE

**MARCADORES MOLECULARES PARA OS GENES *Dt1* E *Dt2* E  
CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS EM SOJA ASSOCIADOS AO  
TIPO DE CRESCIMENTO DAS PLANTAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação  
em Agronomia da Universidade Estadual de  
Londrina, como requisito para obtenção do  
título de Doutor em Agronomia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Antonio Eduardo Pípolo  
EMBRAPA Soja – Londrina – PR

---

Dra. Elisa Serra Negra Vieira  
Embrapa Florestas – Colombo - PR

---

Dr. Jair Rogério Unfried  
TMG – Piracicaba - SP

---

Dr. Luis Fernando Alliprandini  
Monsoy Ltda – Rôlandia - PR.

---

Orientador : Prof. Dr. Cássio Egídio Cavenaghi  
Prete  
UEL – Londrina - PR

---

Coorientador: Prof. Dr. Ivan Schuster  
COODETEC – Rio Verde - Go

Londrina, 18 de fevereiro de 2013

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Manoel (in memorian) e Maria, minha eterna gratidão ao seu amor e dedicação.

As minhas irmãs pelo carinho e estímulo nos estudos.

A minha esposa Meire, aos filhos André, Mariana e Carla pelo incentivo e compreensão

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Departamento de Agronomia e ao Centro de Pós-Graduação e seus professores pelos ensinamentos.

Ao professor Dr. Cássio Egídio Cavenaghi Prete, pela orientação deste trabalho, apoio e pela confiança em mim depositada.

Ao professor Dr. Ivan Schuster, pela coorientação, ensinamentos, dedicação e contribuições valiosas em todas as etapas deste trabalho.

À COODETEC – Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, pela oportunidade e viabilização desta formação.

Ao Dr. Marco Antonio Rott de Oliveira, apoio e pela flexibilização do tempo do meu trabalho, oportunizando meus estudos.

À doutoranda Fabiane Lazzari, por todo auxílio e dedicação nas análises de marcadores moleculares.

Aos colegas da COODETEC que auxiliaram na condução dos experimentos e análises, especialmente aos funcionários do Programa de Melhoramento de Soja e Biotecnologia.

À Embrapa Soja, pela disponibilidade de germoplasma exótico utilizado.

À comissão examinadora, Dr. Antonio Eduardo Pípolo, Dra. Elisa Serra Negra Vieira, Dr. Jair Rogério Unfried e Dr. Luis Fernando Alliprandini pelas contribuições valiosas.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Weda Aparecida Westin, por todo auxílio e suporte ao longo destes anos.

Aos grandes amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela amizade e companherismo em todos os momentos.

A Deus, que sempre nos protegeu nas viagens para chegar à Universidade e retornar para casa com tranquilidade.

Epígrafe:

Apesar de inicialmente termos acreditado que, ao decifrar o código genético humano, entenderíamos os mistérios da vida, torna-se cada vez mais evidente que a vida não é algo tão simples. Quanto mais estudamos uma única célula sequer, mais nos damos conta de sua complexidade  
(Ph.D. Kazuo Murakami)

VICENTE, Dorival. **Marcadores moleculares para os genes *dt1* e *dt2* e características agronômicas em soja associados ao tipo de crescimento das plantas.** 2013. 62f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, PR.

## RESUMO

O tipo de crescimento da haste da soja é característica diferenciadora de cultivares. Os genes, *Dt1* e *Dt2*, afetam a terminação da haste, visto que os tipos de crescimento são classificados em determinado, semideterminado e indeterminado. O tipo de crescimento determinado predominou no Brasil até o início dos anos 2000, ao passo que, na contemporaneidade, há preferência pelo tipo de crescimento indeterminado, principalmente na região centro sul do Brasil. No entanto, a dificuldade de seleção e a tendência de se utilizar com maior frequência cultivares indeterminadas e semideterminadas, nos programas de melhoramento, têm provocado a caracterização fenotípica errônea dos genótipos. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivos: (a) mapear e validar marcadores moleculares para classificar a soja quanto ao tipo de crescimento, buscando facilitar a descrição de cultivares e a seleção genotípica; (b) avaliar características agronômicas de progênies e suas linhas irmãs contrastantes para o gene *Dt1* identificadas pelo fenótipo dos respectivos tipos de crescimento. Para mapeamento e validação dos marcadores moleculares, foram utilizadas duas populações F<sub>2:3</sub>: T 117 (tipo de crescimento semideterminado) x Igra RA 518 RR (tipo de crescimento indeterminado) e CD 235RR (tipo de crescimento determinado) x Igra RA 518 RR. O estudo evidenciou que a associação do marcador molecular ao gene *GmTFL1b* foi eficiente na classificação dos tipos de crescimento em soja. O marcador sat\_064 está ligado ao gene *Dt2*, localizado no Grupo de Ligação G do mapa consenso da soja, com frequência de recombinação de 19,4%. Os marcadores moleculares para os genes *Dt1* e *Dt2* são eficientes na descrição de genótipos quanto ao tipo de crescimento da haste da soja bem como para serem utilizados na seleção em programa de melhoramento. Na avaliação das características de três progênies F<sub>4:6:9</sub> de soja, cada uma com três linhas irmãs as quais contrastam para o gene *Dt1*, utilizando para diferenciação dos tipos de crescimento o fenótipo. Nas progênies avaliadas, não houve diferenças entre os tipos de crescimento indeterminado (*Dt1Dt1*) e determinado (*dt1dt1*) na massa de planta, diâmetro da haste e massa total de grãos. Quanto as linhas com tipo de crescimento semideterminado (*Dt1dt1*), apresentaram massa de planta, diâmetro da haste, número de vagens, número de ramos e massa total de grãos maiores que as linhas com tipo de crescimento indeterminado, e altura de plantas foram maiores que linhas com tipo de crescimento determinado. Além disso, comprimento do racemo da haste é maior nas plantas com tipo de crescimento determinado que em plantas com tipo de crescimento semideterminado. Entre as progênies avaliadas, as do tipo de crescimento determinado apresentam racemos apicais nos ramos nas plantas e as com tipos de crescimento semideterminado e indeterminado não apresentam racemos apicais nos ramos. Nessas linhagens avaliadas, havia um nível de homozigose de 98,4375%, a segregação foi basicamente para o gene *Dt1* de modo a facilitar a classificação de tipos de crescimento.

**Palavras-chave** *Glycine max*. Crescimento determinado. Crescimento semideterminado. Crescimento indeterminado. SAM. Racemo apical.

VICENTE, Dorival. **Molecular markers for genes *dt1* and *dt2* agronomic in soybeans characteristics and associated with type of plant growth.** 2013. 62p. Tese (Doctor in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, PR.

### ABSTRACT

The type of stem growth of soybean is a distinguishing feature of cultivars. The genes *Dt1* and *Dt2* affect termination of the stem, and the types of growth are classified in determinate, semi-determinate and indeterminate. The predominant type of determinate growth in Brazil until the early 2000's. Nowadays preference for type of indeterminate growth is mainly in the central southern Brazil. The difficulty of a precise indication for the growth type in cultivars of soybean is offently present in breeding programs. Phenotypic characterization is sometimes erroneously described. This study aimed to: (a) map and validate molecular markers to classify the type of soybean growth, seeking to facilitate the description of cultivars and genotypic selection, (b) evaluate agronomic characteristics and their sisters contrasting progeny lines for sisters *Dt1* gene identified by the phenotype of the respective types of growth. For mapping and validation of molecular markers were used two populations F<sub>2:3</sub>: T 117 (semi-determinate growth type) x Igra RA 518 RR (sort of indeterminate growth) and CD 235RR (determinate growth type) x Igra RA 518 RR. The study revealed that the association of the molecular marker to the gene *GmTFL1b* was efficient in the classification of types of growth in soybean. The marker sat\_064 was connected to *Dt2* gene which is located in the Liaison Group G of the consensus map of soybeans with recombination frequency of 19.4%. The Molecular markers for genes *dt1* and *dt2* were efficient in describing the genotypes for of soybean stem growth, as well as, for use in selection of a breeding program. The characteristics of three soybean progeny F<sub>4:6:9</sub>, each one with three sisters contrasting lines for gene *Dt1*, using for differentiation of phenotype growth type have been evaluated. Results indicated that there were no differences between indeterminate (*Dt1Dt1*) and determinate (*dt1dt1*) growth types when the mass of plant, stem diameter and total mass of grains. On the other side, semi-determinate growth type lines (*Dt1dt1*) has shown mass of plant, stem diameter, number of pods, number of branches and the total mass of grains larger than of indeterminate soybean growing type. The height of plants were greater on plants of semi determinate growth type. The length of the stem raceme was greater on determinate than plants of semi determinate growth type. The three evaluated progenies exhibited apical racemes on the branches of determinate with semi-determinate. Indeterminate growth types did not show apical racemes in the branches. These strains reached a level of homozygosis of 98.4375%. Segregation was basically for gene *Dt1* which facilitated the classification in soybean of different growth type.

**Key Words** *Glycine max.* Determinate growth. Semi-determinate growth. Indeterminate growth. SAM. Apical raceme.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Amplificação da amplificação com marcador GmTFL1b-pro e digestão com enzima *NdeI*. Planta com tipo de crescimento semideterminado T117 e plantas com tipo de crescimento indeterminado: Igra RA 518 RR, BMX Apolo RR, NK 7059 RR; Plantas com tipo de crescimento determinado: CD 214RR, CD 206RR; 1 a 6 são plantas da população obtida a partir do cruzamento T117 x Igra RA 518 RR cujo fenótipo é indeterminado; M: Marcador de peso molecular de 100 pb .....40
- Figura 2** Amplificação com marcador sat\_064. M: Marcador de peso molecular de 100 pb; T1: Testemunha 1 - Cultivar T117 que apresenta tipo de crescimento semideterminado, conferido pelo gene *Dt2*; T2: Testemunha 2 - Cultivar Igra RA 518 RR, que apresenta tipo de crescimento indeterminado, não possui o gene *Dt2*; A: Plantas com tipo de crescimento semideterminado, derivadas do cruzamento T117 x Igra RA 518 RR; B: Plantas com tipo de crescimento indeterminado, derivadas do cruzamento T117 x Igra RA 518 RR .....41
- Figura 3** Amplificação do DNA de cultivares de soja, utilizando o marcador GmTFL1b-pro e digestão com enzima *NdeI*. M: Marcador de peso molecular de 100 pb .....44
- Figura 4** Amplificação do DNA de cultivares de soja com marcador sat\_064. M: Marcador de peso molecular de 100 pb .....45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Proporção de genótipos e fenótipos em uma geração $F_2$ , pela hibridação de planta de soja com tipo de crescimento semideterminado ( $Dt1Dt1Dt2Dt2$ ) x tipo de crescimento determinado ( $dt1dt1dt2dt2$ ).....	16
<b>Tabela 2</b>	Posição de sítios polimórficos informativos (SNPs) na sequência genômica de GmTFL1b (LIU et al.,2010).....	18
<b>Tabela 3</b>	Cultivares de soja e seus respectivos fenótipos de tipo de crescimento da haste descritos pelos obtentores .....	39
<b>Tabela 4</b>	Tabela de contingência com dados moleculares e fenotípicos obtidos nas análises realizadas na população $F_{2:3}$ da população CD 235RR e Igra RA 518 RR.....	42
<b>Tabela 5</b>	Tabela de contingência com dados moleculares e fenotípicos obtidos nas análises realizadas na população $F_{2:3}$ do cruzamento T117 e Igra RA 518 RR.....	43
<b>Tabela 6</b>	Média da quantificação de características de planta de soja (massa de planta, altura de planta, diâmetro da haste, número de nós na haste principal, número de vagens, número de grãos por vagem, massa de 1000 grãos e massa total de grãos) das progênies CD 10-71690, CD 10-71822 e CD 10-71463, expressando os tipos de crescimento determinado, semideterminado e indeterminado .....	56
<b>Tabela 7</b>	Média da quantificação de características de planta de soja (grau de acamamento, número de nós férteis, comprimento do racemo da haste, número de vagens no racemo da haste e número de ramos) das progênies CD 10-71690, CD 10-71822 e CD 10-71463, expressando os tipos de crescimento determinado, semideterminado e indeterminado .....	58
<b>Tabela 8</b>	Identificação de racemo apical em ramos, em plantas de soja com tipos de crescimento determinado, semideterminado e indeterminado .....	59

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 CULTURA DA SOJA.....	14
2.1.1 Taxionomia, Genética e Morfologia.....	14
2.1.2 Tipo de Crescimento da Haste .....	15
2.1.3 Histórico da Mudança de Tipos de Crescimento em Soja.....	18
2.2 MARCADORES MOLECULARES .....	19
2.2.1 Tipos de Marcadores Moleculares .....	21
2.2.1.1 Microssatélites (SSR) .....	21
2.2.1.2 Polimorfismo de única base (SNPs) .....	22
2.3 SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES.....	23
2.4 MAPA CONSENSO DA SOJA .....	23
<b>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	25
<b>4 ARTIGO 1 - MAPEAMENTO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA SELEÇÃO DOS GENES Dt1 E Dt2 QUE DETERMINAM TIPO DE CRESCIMENTO DA HASTE DA SOJA</b> .....	31
4.1 INTRODUÇÃO.....	32
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.2.1 Material Genético .....	34
4.2.2 Avaliação Fenotípica .....	34
4.2.3 Extração de DNA.....	35
4.2.4 Amplificação do Gene Dt1.....	36
4.2.5 Mapeamento do Gene Dt2 .....	37
4.2.6 Avaliação da Eficiência da Seleção com Marcador Molecular para Tipo de Crescimento em Soja.....	37
4.2.7 Avaliação de Cultivares com Marcadores para Genes Dt1 e Dt2.....	38
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
4.4 CONCLUSÕES.....	46
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46

<b>5 ARTIGO 2 - CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS EM SOJA</b>	
<b>ASSOCIADOS AO TIPO DE CRESCIMENTO DAS PLANTAS.....</b>	<b>49</b>
5.1 INTRODUÇÃO.....	50
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	52
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
5.4 CONCLUSÕES.....	60
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os tipos de crescimento da haste da cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merr.] influencia várias características agrônômicas. Plantas com tipo de crescimento determinado, geralmente, atingem alturas menores, sendo mais resistentes ao acamamento, menor altura e inserção da primeira vagem e maior número de ramos por planta, quando comparado a cultivares de tipo de crescimento indeterminado de grupo de maturidade semelhante. Além disso, genótipos com tipo de crescimento determinado também apresentam menor período de floração do que genótipos de tipo indeterminado (BERNARD, 1972; KILGORE-NORQUEST & SNELLER, 2000).

Dois genes, *Dt1* e *Dt2*, afetam a terminação da haste em soja (BERNARD, 1972). Um alelo recessivo, *dt1*, e um alelo dominante, *Dt2*, apressam o término do crescimento apical da haste, o que diminui a altura da planta e número de nós. Desses, *dt1* tem um efeito muito maior. BERNARD (1972) observou um fenótipo, intermediário, semideterminado, distinto dos fenótipos indeterminado e determinado. Essas plantas semideterminadas segregaram para tipos indeterminado e determinado, indicando que *Dt1* comportou-se como um gene parcialmente dominante. Plantas com os dois genes *Dt1* e *Dt2*, em homozigose, apresentam fenótipo similar ao tipo de crescimento semideterminado heterozigoto (*Dt<sub>1</sub>dt<sub>1</sub>*).

Plantas com tipo de crescimento determinado sempre foram muito distintas, porém, os testes de progênie, ocasionalmente, mostraram que plantas semideterminadas ou indeterminadas foram classificadas erroneamente (BERNARD, 1972).

No início do século XXI, 93% das cultivares de soja protegidas no Brasil eram de tipo de crescimento determinado (BRASIL, 2002). No ano agrícola de 2010/2011, entre as dez cultivares de soja mais semeada, metade apresentou o tipo de crescimento indeterminado e a outra metade determinado, como se identifica na região Sul do país: entre as cinco cultivares mais semeadas, foram as cultivares de tipo de crescimento indeterminado (KLEFFMANN & PARTNER, 2011). Os agricultores brasileiros estão mudando sua preferência de tipo de crescimento. Os programas de melhoramento, visando atender a demanda, enfrentam a necessidade de seleção, descrição e distinção dos tipos de crescimento determinado, semideterminado e indeterminado.

O tipo de crescimento é uma característica diferenciadora de cultivares de soja e faz parte das exigências mínimas da UPOV (União Internacional para a Proteção de Novas Variedades de Plantas) como descritor das cultivares para fins de proteção da propriedade intelectual. Nesse sentido, consideram-se os tipos de crescimento determinado, semideterminado e indeterminado (SNPC, 2012).

A caracterização — assistida por marcadores moleculares — apresenta-se como uma ferramenta de grande auxílio para identificar com precisão os tipos de crescimento da haste da soja.

A base molecular do tipo de crescimento foi dissecada por Liu et al., 2010. A partir do genoma da soja e análise de mapeamento, sugeriram que o gene *Dt<sub>1</sub>* codifica a proteína GmTFL1b e que o tipo de crescimento da haste da soja é determinado pela variação deste gene.

Apesar da importância agronômica do tipo de crescimento da haste na produção de soja, o conhecimento acerca da influência do tipo de crescimento da haste, sobre outras características de importância agronômica em soja cultivada nos trópicos, é limitado. Diante dessa circunstância, houve a necessidade de se investigar se o tipo de crescimento tem relação com produtividade e características relacionadas.

O presente trabalho tem como objetivos: (a) mapear e validar marcadores moleculares para classificar a soja quanto ao tipo de crescimento, na tentativa de facilitar a descrição de cultivares e a seleção genotípica; (b) avaliar características agronômicas de progênies e suas linhas irmãs contrastantes para o gene *Dt1* identificadas pelo fenótipo dos respectivos tipos de crescimento da haste.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CULTURA DA SOJA

Evidências históricas e geográficas indicam que o centro primário de diversidade genética da soja está localizado na região leste da Ásia, provavelmente na região Centro-Sul da República Popular da China. A região chinesa da Manchúria foi onde a soja foi domesticada e constitui o centro secundário de diversidade genética (XU et al., 1989). Atualmente, 23.587 etnovariedades de soja — coletadas de 29 províncias da China — estão depositadas no banco genético chinês, o que representa o maior reservatório mundial de diversidade genética de soja (Li, 2008). Algumas das etnovariedades ainda são semeadas para produção em várias províncias do sul da China, e algumas são usadas em todo o mundo para desenvolver cultivares de soja modernas (CARTER et al., 2004; LI, 2008). O conhecimento do centro de origem primário e secundário e banco de germoplasma de etnovariedades de uma espécie cultivada são importantes para o sucesso de programas de melhoramento. Frequentemente, há necessidade de buscar variabilidade genética para desenvolver cultivares que atendam as demandas de novos ideótipos de plantas e tolerância a novas doenças e pragas, o que deve ser encontrado no banco de germoplasma.

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é um dos mais importantes fornecedores de proteínas derivadas de vegetais, estando presente em mais de um quarto dos alimentos e da ração animal no mundo (GRAHAM & VACE, 2003). Sugere-se, portanto, que a soja foi domesticada do seu parental selvagem *G. soja* Sieb e Zucc, na China cerca de 5.000 anos atrás, resultando em uma infinidade de variedades crioulas de soja que foram adaptadas a ambientes climáticos diversos (CARTER et al., 2004).

#### 2.1.1 Taxionomia, Genética e Morfologia

A soja cultivada (*Glycine max*) é uma planta anual e herbácea, pertencente à família *Fabaceae*, divisão *Magnoliophyla*, classe *Magnoliopsida*, subclasse *Rosidae* e ordem *Fabales* (CAPELLARI Jr. et al., 1999).

O gênero *Glycine* é formado por dois subgêneros: *Glycine* e *Soja*. O subgênero *Glycine* inclui as espécies anuais: a soja cultivada *G. max* e a soja selvagem *G. soja*. Essas duas espécies são alotetraploides ( $2n = 40$ ), com comportamento meiótico de um diploide normal, e são facilmente cruzadas, constituindo efetivamente uma espécie simples (PROBST & JUDD, 1973; SINGH & HYMOWITZ, 1988). Estas apresentam alto grau de autopolinização e são consideradas como linhagens endogâmicas. Além dessas, existem outras 22 espécies perenes reconhecidas dentro do gênero *Glycine*, das quais *Glycine tabacina* e *Glycine tomentella* são neopoliplóides ( $2n=78, 80$ ) (HYMOWITZ, 2004).

O genoma da soja possui tamanho médio, comparado com muitas outras plantas, compreendendo 1.115 milhões de pares de bases por genoma haploide (SHOEMAKER et al., 2003). Mais de 35% do genoma é constituído de heterocromatina, com o braço curto de seis dos 20 cromossomos bivalentes completamente heterocromáticos (SING & HYMOWITZ, 1988). Apresenta ainda entre 40 a 60% de sequências de DNA repetitivo e, das sondas RFLP testadas, aproximadamente 90% detectaram locos duplicados (SHOEMAKER et al., 1996) e cerca de 60% detectaram três ou mais locos. Considera-se que sua história de poliploidia seja a razão de genes duplicados (dois genes independentes controlando a mesma característica) (PALMER & KILEN, 1987).

Durante o desenvolvimento de uma planta de soja, aparecem quatro tipos distintos de folhas: (a) dois cotilédones, que constituem o primeiro par; (b) um par de folhas simples, unifolioladas, as primárias, que se sucedem aos cotilédones; (c) as folhas trifolioladas que seguem as primárias e constituem todas as demais folhas da planta, inclusive nas ramificações e na região floral; (d) os pró-filos, pequenos e pouco diferenciados, e que se encontram nas bases dos ramos laterais (MÜLLER, 1981).

### 2.1.2 Tipo de Crescimento da Haste

Para a espécie *Glycine soja*, o tipo de crescimento determinado da haste é inexistente ou rara. Para a *G. max*, o tipo de crescimento determinado está associado com sua domesticação (LIU et al., 2007; TIAN et al., 2010).

O tipo de crescimento da haste, na soja, depende da inflorescência, se axilar ou se axilar e terminal. Existem três tipos de crescimento: determinado,

semideterminado e indeterminado. O tipo de crescimento determinado termina com um racemo terminal na haste. Por ocasião da floração, a planta já atingiu cerca de 87 – 90% de sua altura e matéria seca final. Pode-se afirmar que é melhor definida a fase reprodutiva da vegetativa. O tipo de crescimento indeterminado não apresenta racemo terminal, mesmo assim, a gema terminal continua sua atividade vegetativa e as inflorescências são apenas axilares. Neste caso, no início do florescimento, a planta apresenta apenas 50 – 60% da altura final. O tipo semideterminado é um intermediário em relação aos tipos determinado e indeterminado. Apresenta racemo terminal, porém, por ocasião do início do florescimento, possui apenas 60- 70% da altura final (SEDIYAMA, 1985).

Os dois genes *Dt1* e *Dt2*, que afetam a terminação da haste, foram descritos por BERNARD (1972). Tendo como base este estudo, VERNETTI (1983) detalhou o fenótipo correspondente a cada genótipo possível em uma geração  $F_2$ , pela combinação dos quatro alelos, dois a dois (Quadro 1).

**Tabela 1** Proporção de genótipos e fenótipos em uma geração  $F_2$ , pela hibridação de planta de soja com tipo de crescimento semideterminado ( $Dt1Dt1Dt2Dt2$ ) x tipo de crescimento determinado ( $dt1dt1dt2dt2$ ).

Proporção	Genótipo $F_2$	Fenótipo $F_2$
1	<i>Dt1 Dt1 dt2 dt2</i>	Indeterminado <sup>1/</sup>
1	<i>Dt1 Dt1 Dt2 Dt2</i>	Semideterminado <sup>2/</sup>
2	<i>Dt1 Dt1 Dt2 dt2</i>	Semideterminado <sup>2/</sup>
2	<i>Dt1 dt1 Dt2 Dt2</i>	Semideterminado <sup>2/</sup>
4	<i>Dt1 dt1 Dt2 dt2</i>	Semideterminado <sup>2/</sup>
2	<i>Dt1 dt1 dt2 dt2</i>	Semideterminado <sup>3/</sup>
1	<i>dt1 dt1 Dt2 Dt2</i>	Determinado <sup>4/</sup>
2	<i>dt1 dt1 Dt2 dt2</i>	Determinado <sup>4/</sup>
1	<i>dt1 dt1 dt2 dt2</i>	Determinado <sup>4/</sup>
1/ <sup>1/</sup>	<i>Dt1dt2</i>	Causam tipo indeterminado
2/ <sup>2/</sup>	<i>Dt2</i>	Acelera a finalização do crescimento apical
3/ <sup>3/</sup>	<i>Dt1</i>	Apresenta dominância parcial sobre <i>dt1</i>
4/ <sup>4/</sup>	<i>dt1</i>	É epistático sobre <i>Dt2</i> , <i>dt2</i>

Outro alelo recessivo, *dt1-t*, também afeta o fenótipo da planta. Embora plantas com genótipo *dt1-tdt1-t* e *Dt2Dt2* apresentem fenótipo semelhantes para altura da planta, *dt1-tdt1-t* é mais semelhante ao *dt1dt1* quando se considera

folhas e traços estaminais no ápice da haste de plantas de soja (THOMPSON et al., 1997).

A disponibilidade da sequência do genoma, além de várias ferramentas e abordagens para espécies modelo, como *Arabidopsis thaliana*, tem ajudado as análises funcionais de um número crescente de genes e rotas genéticas (SWARBRECK et al., 2008).

O gene *Dt1* foi mapeado com marcadores moleculares no GL L (TIAN et al., 2010; CREGAN et al., 1999; LIU et al., 2007), e o gene *Dt2* foi mapeado no GL G (MUEHLBAUER et al., 1989; CREGAN et al., 1999), que agora são designados cromossomo 19 e 18, respectivamente (SCHMUTZ et al., 2010).

LIU et al. (2010) confirmaram que *Dt1* codifica a proteína GmTFL1b e que o tipo de crescimento em soja é determinado pela variação deste gene. A partir de sequenciamento, os autores encontraram quinze polimorfismos na sequência gênica constituída por 4216pb. Dos quinze, três foram observados consistentemente diferenciados entre linhagens determinadas e indeterminadas, sendo dois SNPs – Polimorfismo de Única Base, um no promotor e outro no éxon 4, e uma substituição no íntron 1 (posição 279).

Análises de associação dos três polimorfismos para tipo de crescimento em 16 cultivares sugerem que a substituição no éxon 4 foi a mais consistente, com a diferença no número de nós produzidos depois do estágio R1. O SNP causa a substituição de uma Arginina no alelo *Dt1* por um triptofano no alelo *dt1* (LIU et al., 2010).

Os dois SNPs, da região promotora e do éxon 4, estão representados na Tabela 2, na qual os números -1487 e 1283 representam a posição na linhagem referência em pb (pares de bases) (GenBank: AB511820.1), a partir da Adenina no códon de iniciação. As linhagens de tipo de crescimento determinado possuem o nucleotídeo destacado em vermelho, o qual é substituído pelo nucleotídeo em azul nas linhagens com tipo de crescimento indeterminado. Estas duas mutações foram observadas entre linhagens determinadas (TK, MI, Hdt1) e linhagens indeterminadas (MO, HA, H4) (LIU et al., 2010).

**Tabela 2** Posição de sítios polimórficos informativos (SNPs) na sequência genômica de GmTFL1b (LIU et al.,2010).

Posição	Linhagem de tipo determinado	Linhagem de tipo indeterminado
	Seq (5´- 3´)	Base trocada
-1487	CATATACCACA	G
1283	CACAGTGGGAA	A

### 2.1.3 Histórico da Mudança de Tipos de Crescimento em Soja

Cultivares da soja, no nordeste da China, apresentam todos os tipos de crescimento. Cultivares com tipo de crescimento indeterminado representavam 60-70% da área total de soja semeada antes de 1950, enquanto que as cultivares determinadas desempenharam um papel importante entre de 1960 a 1980 (WANG, 1996). Em ambientes favoráveis, cultivares com tipo de crescimento determinado apresentam melhor rendimento do que cultivares com tipo de crescimento indeterminado e rendimento semelhante quando ocorreu estresse durante as fases vegetativas tardias e reprodutivas. Cultivares semideterminadas dominava toda a área cultivada com soja no nordeste da China, no início do século XXI (DU, 1987; XUE et al., 2006).

No Brasil, até o ano de 2002, foram protegidas 124 cultivares de soja. Destas, 93% foram descritas com tipo de crescimento determinado; 6%, com o tipo de crescimento indeterminado e duas cultivares estavam descritas com tipo de crescimento semideterminado (BRASIL, 2002). Em relação a cultivares de tipo semideterminado, uma delas está descrita, pelo obtentor, apresentando tipo de crescimento determinado.

A predominância de cultivares, de tipo de crescimento determinado no Brasil, foi alterada pela demanda dos agricultores de semeaduras de cultivares da soja em épocas antecipadas para o cultivo de milho (*Zea mays*) no mesmo ano agrícola (STULP et al., 2009; BRANCCINI et al., 2010). Também o aparecimento da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhisi*), na safra 2001/2002, houve necessidade da adoção das cultivares precoce e semeaduras no início da época recomendada para o cultivo da soja (YORINORI et al., 2003). As cultivares de tipo de crescimento indeterminado apresentaram maior adaptação à época de semeadura antecipada e precocidade.

No país, no ano agrícola de 2010/2011 entre as dez cultivares de soja mais semeada, metade apresentou o tipo de crescimento indeterminado e a outra metade determinado, uma vez que, na região Sul, as cinco cultivares mais semeadas foram as cultivares de tipo de crescimento indeterminado (KLEFFMANN & PARTNER, 2011). Por esse motivo, está havendo mudanças na preferência de tipo crescimento da haste pelos agricultores brasileiros, para plantas de soja com tipo de crescimento indeterminado. Quanto a plantas com tipo de crescimento semideterminado, há poucas cultivares disponíveis no Brasil e este descritor pode não coincidir com o genótipo.

## 2.2 MARCADORES MOLECULARES

A natureza hereditária de todo o organismo vivo é definida por seu genoma que, ao consistir em uma longa sequência de ácido nucléico, fornece a informação necessária para construir o organismo. Assim, um gene é uma sequência de DNA que codifica um RNA. Em genes que codificam proteínas, o RNA, por sua vez, codifica a proteína (LEWIN, 2009).

Os marcadores morfológicos são conhecidos pelos melhoristas de plantas e já muito utilizados para estudos genéticos — como ligação gênica — e para construções de mapas genéticos. No entanto, a probabilidade de associações significativas entre marcadores morfológicos e caracteres agronomicamente importantes era reduzida, devido ao pequeno número desses marcadores em uma mesma linhagem, tornando este uso limitado (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; GUIMARÃES & MOREIRA, 1999).

Os marcadores morfológicos e bioquímicos foram extensamente estudados até o advento das técnicas de manipulação de DNA. Estas possibilitaram que um número quase ilimitado de novos marcadores genéticos fosse detectado no genoma (VIEIRA et al., 2004).

Nesse aspecto, a utilização de marcadores moleculares em programas de melhoramento de plantas possibilita análises genéticas mais detalhadas, principalmente na introgressão de características de herança simples, pelas quais têm demonstrado vários resultados positivos. Já em relação à seleção assistida por marcadores, que envolvem características quantitativas, pouco tem sido feito em termos de aplicação prática (YOUNG, 1999).

Com o surgimento das tecnologias modernas da Genética e da Biologia Molecular, surgiram diversos tipos de marcadores que detectam o polimorfismo genético diretamente no DNA (FALEIRO, 2007). Por marcador molecular, define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA, correspondente a uma região expressa ou não do genoma. O princípio da utilização destes marcadores é baseado no dogma central da biologia molecular e na pressuposição de que diferenças genéticas no DNA significam, na maioria das vezes, diferenças fenotípicas (BORBA, 2002; FALEIRO, 2007).

O exemplo mais concreto de melhoramento genético assistido por marcadores é a introgressão de genes por retrocruzamento. Germoplasmas, não adaptados, têm sido utilizados em programas de melhoramento com o objetivo de introduzir características de herança simples, como resistência a patógenos e pragas. O uso de marcadores moleculares, ligados a esses genes, é de grande importância na seleção de genótipos resistentes, principalmente quando o programa de melhoramento tem como objetivo a introdução de dois ou mais genes de resistência — quando o fenótipo é de determinação complexa; ou quando o processo de avaliação requer a destruição da planta. A progênie de cada ciclo de cruzamento é avaliada com base na presença de uma marca associada à característica de interesse. Este procedimento não apenas mascara o efeito de alelos dominantes como também elimina a variabilidade devido a efeitos ambientais, de modo a simplificar padrões de herança para características complexas (RAFALSKI e SCOTT, 1993).

MICHELMORE et al. (1991) desenvolveram a técnica de bulks segregantes - BSA (Bulked Segregant Analysis), que tem revolucionado a identificação de regiões genômicas associadas a caracteres de herança simples. Essa metodologia se baseia na construção de dois bulks de DNA contrastantes para uma característica fenotípica entre os indivíduos de uma população segregante. Cada bulk é constituído de uma mistura de DNAs de indivíduos de uma população segregante com fenótipo semelhante para a característica de interesse. Desta forma, todos os indivíduos que compõem um bulk compartilham uma mesma região genômica, que contém o gene de interesse, e segregam para as demais regiões. Assim, o marcador que co-segregar com os bulks tem uma grande probabilidade de estar ligado à característica avaliada, sem necessitar da genotipagem de um grande

número de indivíduos nem da construção de um mapa genético saturado (MICHELMORE et al., 1991).

De acordo com LANZA et al. (2000), a aplicação das técnicas que fazem uso dos marcadores moleculares de DNA — para acelerar e monitorar os programas de melhoramento genético — tem, como consequência, grandes avanços no desenvolvimento de variedades melhoradas.

## 2.2.1 Tipos de Marcadores Moleculares

Dentre as variações da técnica de análise de polimorfismo no DNA, as mais utilizadas, tanto por motivo de maior confiabilidade quanto por um menor custo, tempo reduzido dentre outras particularidades, estão: Microssatélites (SSR) e Polimorfismo de Única Base (SNPs) (SEIXAS, 2011).

### 2.2.1.1 Microssatélites (SSR)

No genoma dos organismos eucariontes, existem muitas sequências repetitivas de DNA que se localizam em regiões de micro e mini-satélites. Nas drosófilas, por exemplo, 30% do genoma é formado por este tipo de sequência; no arroz, 50%, e no tabaco chega a 70% (LEWIN, 2009). Marcadores Microssatélites, também denominadas SSR (*Simple Sequence Repeats* ou Sequência Simples Repetidas ou Sequências de DNA Microssatélites), têm sido um dos mais utilizados nos programas de melhoramento de plantas e são baseados na técnica de PCR. Os microssatélites consistem-se de unidades núcleo de 2-5 nucleotídeos tais como (CA), (ATT) ou (ATGT) que são repetidas em tandem no genoma (LITT & LUTY, 1989). As repetições em tandem destas pequenas sequências podem ocorrer de dezenas a centenas de vezes. As regiões que flanqueiam um microssatélite são geralmente únicas e conservadas entre genótipos da mesma espécie e *primers* são construídos para estas regiões e utilizados para amplificar fragmentos de DNA contendo o microssatélite. Polimorfismo de comprimento é criado quando produtos de PCR de diferentes alelos variam no comprimento, como resultado da variação do número de unidades repetidas no microssatélite, podendo então ser analisados por eletroforese em gel de acrilamida ou gel de agarose. O alto nível de informação e a codominância de marcadores microssatélites, sua grande ocorrência em genomas

eucarióticos e sua fácil amplificação via tecnologia padrão de PCR, tornou os microssatélites marcadores preferidos para várias espécies (LANZA et al., 2000; FALEIRO, 2007). Marcadores microssatélites têm sido amplamente utilizados em estudos de herança, mapeamento molecular de locos para caracteres quantitativos (QTLs) e genes de resistência e seleção assistida de linhagens e cultivares de trigo com resistência a giberela (ANDERSON, 2007; BUERSTMAYR et al., 1999).

Em soja, mais de 1000 microssatélites já foram identificados e estão disponíveis comercialmente. MORGANTE et al. (2002) e CARDLE et al. (2000) (em SONG et al., 2004) sugeriram que microssatélites estão, significativamente, associados à fração do genoma de plantas de baixo número de cópias, baseado na estimativa da densidade de microssatélites em *Arabidopsis thaliana*, arroz, soja, milho e trigo. Os marcadores microssatélites em soja têm sido muito utilizados para o mapeamento de genes específicos que determinam características importantes e, também, para a identificação de QTLs de importância econômica envolvidos na produtividade de grãos e na resistência genética a pragas e doenças, que são características de herança complexa (WEBB et al., 1995; CHANG et al., 1996; MANSUR et al., 1996; CONCIBIDO et al., 1997; NJIT et al., 1997; MEKSEM et al., 1999; MIAN et al., 1999; ARAHANA et al., 2001; BACHMAN et al., 2001; SCHUSTER et al., 2001; YANG et al., 2001; YUAN et al., 2002).

#### 2.2.1.2 Polimorfismo de Única Base (SNPs)

Polimorfismo de única base ou *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs) são marcadores moleculares de DNA utilizados para identificar mutações e polimorfismos, baseados na posição de um único nucleotídeo (FALEIRO, 2007). Os SNPs são fontes abundantes de variação genética, gerados por substituição de uma única base ou pequenos eventos de inserção ou deleção. As mutações mais comuns são as chamadas transições, nas quais ocorrem trocas de uma purina por outra purina (A – G), ou de uma pirimidina por outra pirimidina (C – T). Mutações menos frequentes — chamadas de transversões — ocorrem quando existe a troca de pirimidina por uma purina ou vice-versa (A - C, A - T, G - C e G - T) (CAETANO, 2009). SNP's são marcadores bi alélicos, ou seja, normalmente são detectados apenas duas variantes. Dessa maneira, o conteúdo de polimorfismo detectado é

menor, quando comparado com o polimorfismo detectado por marcadores microssatélite (SSR), que são multialélicos (CAETANO, 2009).

A disponibilidade e facilidade de buscar sequências de genes, nos bancos de dados, fez com que uma grande quantidade de marcadores SNP's pudesse ser desenvolvida. Os marcadores SNP's são uma fonte inesgotável de marcadores polimórficos para estudo de associação baseados em genes candidatos. Tal polimorfismo pode ser usado para o desenho de marcadores próximos ou até mesmo dentro do próprio gene de interesse (FALEIRO, 2007; GUIMARÃES et al., 2007).

A frequência de SNPs no genoma soja é considerada baixa, de aproximadamente 1,98/kbp e 4,68/kbp em regiões codantes e não codantes, respectivamente, estimado em 25 genótipos (ZHU et al., 2003).

### 2.3 SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES

Para que os marcadores moleculares sejam utilizados nos programas de melhoramento, eles devem ser eficientes e econômicos. Na maior parte das vezes, em que os marcadores moleculares são utilizados no melhoramento de plantas, eles complementam os métodos tradicionais de melhoramento, dando-lhes um refinamento, e aumentando as chances de sucesso. A seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) deve ser vista, então, como um suplemento aos métodos convencionais de melhoramento (SCHUSTER & OLIVEIRA, 2006).

A partir disso, devem-se considerar critérios práticos para efetivamente programar a utilização de SAM num programa de melhoramento, como: eficiência ou ganho comparado à seleção fenotípica, utilidade dos marcadores em populações relevantes e o custo, o rendimento e a experiência requerida (ANDERSON et al., 2007).

### 2.4 MAPA CONSENSO DA SOJA

Os mapas genéticos (ou de ligação) identificam a distância entre as mutações em termos de frequências de recombinação. Um mapa de ligação pode também ser construído medindo-se a recombinação entre sítios de DNA genômico.

Dentre vários mapas genéticos publicados para a soja (KEIN et al., 1997; SHOEMAKER & SPECHT, 1995), uma grande contribuição foi a construção de um mapa genético consenso, que integrou cinco populações de mapeamento. Este mapa integrado é constituído de 20 grupos de ligação, com mais de 1000 marcadores SSR e com saturação média de 2,5 cM entre marcadores (CREGAN et al., 1999; SONG et al., 2004). Nesse sentido, marcadores, associados a um QTL de interesse, podem ser usados dentro do mapa de ligação em outra população (SCHUSTER, 2001).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J. A. Marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat. Int. **Journal of Food Microbiol.** v.119, p.51-53. 2007.
- ARAHANA, V.S.; GRAEF, G.L.; SPECHT, J.E.; STEADMAN, J.R.; ESKRIDGE, K.M. Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Crop Sci**, v.41, p.180-188, 2001.
- BACKMAN, M.S.; TAMULONIS, J.P.; NICKELL, C.D.; BENT, A.F. Molecular markers linked to brown stem rot resistance genes, [Rbs.sub.1] and [Rbs.sub.2], in soybean. **Crop Sci**, v.41, n.2, p.527-535, 2001.
- BERNARD, R.L. Two genes affecting stem termination in soybean. **Crop Sci** 12: 235-239, 1972.
- BORBA, V.S. **Marcadores Moleculares: Classificação e Aplicações**. Disponível em: <<http://www.ufv.com.br/dbg/trab2002/GMOL/GMOL005.htm>>. Acesso em: 08 jan. de 2013.
- BRACCINI, A.L.; STÜP, M.; ALBRECHT, L.P.; ÁVILA, M.R; SCAPIM, C.A.; RICCI, T.T. Desempenho agrônômico e produtividade na sucessão soja-milho safrinha. **Acta Scientiarum: Agronomy** 32(4) 651, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. **Catálogo de cultivares protegidas de soja (*Glycine max.* (L.) Merrill)**. Brasília, 2002. 133p.
- BUERSTMAYR, H.; LEMMENS, M.; FEDAK, G.; RUCKENBAUER, P. Back-cross reciprocal monosomic analysis of *Fusarium* head blight resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical Applied Genetics**. Vol: 98, p.76-85, 1999.
- CAETANO, A.R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **R. Bras. Zootec.**, 38:64-71, 2009.
- CAPELLARI JUNIOR, L.; RODRIGUES, R.R.; SOUZA, V.C. **Apostila de botânica sistemática**. Piracicaba: Departamento de Botânica, ESALQ/USP, 1999. 95p.
- CARTER, T; NELSON, R.; SNELLER, C; CUI, Z. **Soybeans: Improvement Production and Uses** (Am Soc of America, Crop Sci Soc of America, Soil Sci Soc of America, Madison, WI), p. 303–416, 2004.
- CONCIBIDO, V.; BOUTIN, S.; DENNY, R.; HAUTEA, R.; ORF, J.; YOUNG, N.D. Genome mapping of a soybean cyst nematode resistance gene in Peking, PI 91763 and PI 88788 using DNA markers. **Crop Sci**, v.37, p.258-264, 1997.
- CREGAN, P.B.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G; KAHLER, A.L.; KAYA, N.; VAN TOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, J.; SPECHT, J.E. An Integrated Genetic Linkage Map of the Soybean Genome. **Crop Sci**, 39: 1464–1490, 1999.

- CHANG, S.J.C.; DOUBLER, T.W.; KILO, V.; SUTTNER, R.; SCHIMIDT, M.E.; GIBSON, P.T.; LIGHTFIIT, D.A. Two additional loci underlying durable field resistance to soybean sudden death syndrome (SDS). **Crop Sci**, v.36, p.1684-1688, 1996.
- DU, W.G., Investigation on high-yield breeding in soybean. **Heionjiang Agric. Sci.** 5, 1–5. 1987.
- FALEIRO, F.G. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina. DF: **Embrapa Cerrados**, 102p. 2007.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. 3ed Brasília: **EMBRAPA-CENARGEM**, 220p. 1998.
- GRAHAM, P.H., VANCE, C.P. Legumes: Importance and constraints to greater use. **Plant Physiol**, 131:872–877, 2003.
- GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 715-740, 1999..
- GUIMARÃES, E.P.; RUANE, J.; SCERF, B.D.; SONNINO, A.; DARGIE, J.D. **Marker-assisted selection**. Roma: Editora Food and agriculture organization of the united nations, 494p. 2007.
- KEIN P.; DIERS, B.W.; OLSON, T.C.; SHOEMAKER, R.C. RFLP mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits. **Genetics** 126:735-742. 1990.
- HYMOVITZ, T. Speciation and Cytogenetics. In BOERMA, H.R; SPECHT, J.E. (eds). **Soybeans:improvement, production and uses**. Ed.3. Agronomy monograph n°16. American Society of Agronomy –Crop Science Society of America – Soil Science Society of America, Madison, p.97-136, 2004.
- KILGORE-NORQUEST, L.; SNELLER, C.H. Effect of stem termination on soybean traits in southern U.S production systems. **Crop Sci** 40: 83-90, 2000.
- KLEFFMANN & PARTNER comércio e assessoria mercadológica e representação. **Amis seed soybean 2010/2011**, 2011. <<http://www.kleffmann.com.br>>
- LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.21, n.204, p. 97-108, 2000.
- LEWIN, B. **Genes IX 9 ed.** – Porto Alegre: Artmed, 2009. 912 p.
- LI, Y.; GUAN, R.; LIN, Z.; MA, Y.; WANG, L.; LI, L.; LIN, F.; LUAN, W.; CHEN, P.; YAN, Z.; GUAN, Y.; ZHU, L.; NING, X.; SMULDERS, M.J.M.; LI, W.; PIAO, R.; CUI, Y.; YU, Z.; GUAN, M.; CHANG, R.; HOU, A.; SHI, A.; ZHANG, B.; ZHU, S.; QIU, L.

Genetic structure and diversity of cultivated soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) landraces in China. **Theor Appl Genet** 117:857–871, 2008.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics** v44, p.398:401, 1989.

LIU, B; FUJITA, T;YAN, Z-H; SAKAMOTO, S.; XU, D.; ABE, J. QTL mapping of domestication-related traits in soybean (*Glycine max*) **Annals of Botany** 100:1027–1038, 2007.

LIU, B.; WATANABE, S.; UCHIYAMA, T.; KONG, F.; KANAZAWA A.; XIA, Z.; NAGAMATSU, A.; ARAI, M.; YAMADA, T.; KITAMURA, K.; MASUTA, C.; HARADA, K.; ABE, J. The soybean stem growth habit gene *Dt1* is an ortholog of Arabidopsis *TERMINAL FLOWER1*. **Plant Physiol** 153: 198-210, 2010.

MANSUR, L.M.; ORF, J.H.; CHASE, K.; JARVIK, T.; CREGAN, P.B.; LARK, K.G. Genetic mapping of agronomic trait using recombinant inbred lines of soybean. **Crop Sci**, v.36, p. 1327-1336, 1996.

MEKSEM, K.; DOUBLER, T.W.; CHANCHAROENCHAI, K.; NJITI, V.; CHANG, S.J.C.; RAO-ARELLI, A.P.; CREGAN, P.; GRAY, L.E.; GIBSON, P.T.; LIGHTFOOT, D.A. Clustering among loci underlying soybean resistance to *Fusarium soloni*, SDS and SCN in near-isogenic lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.1131-1142, 1999.

MIAN, M.A.R.; WANG, T.Y.; PHILLIPS, D.V.; ALVERNAZ, J.; BERMAN, H.R. Molecular mapping of the *Rcs3* gene for resistance to frogeye leaf spot in soybean. **Crop Sci**, v.39,n.6, p.1687-1691, 1999.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of National Academy of Science-USA**, v.88, p. 9828-9832, 1991.

MÜLLER, L. Morfologia, Anatomia e Desenvolvimento. In: Miyasaka, S.; Medina, J.C. (ED.). **A soja no Brasil**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1981. P 73-104.

NJITI, V.N.; SCHIMIDT, C.A.; SCHMIDT, M.E.; LIGHTFOOT, D.A. Mapping loci underlying yield in Illinois. **Soybean Genetics Newsletter**, v.24, p.136-138, 1997.

PALMER, R.G.; KILEN, T.C. Qualitative genetics and cytogenetics. In: WILCOX, J.R. (Ed.). **Soybeans: improvement, production and uses**. Madison: ASA, CSSA, SSSA, 1987. p.135-209. (Agronomy, 16).

PROBST, A.H.; JUDD, R.W. Origin U.S. history and development and word distribution. In CALDEWLL, B.E. **Soybeans, improvement, production and uses**. Madison ASA, 618p.1973.

RAFALSKI, J.A., SCOTT, V.T. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. **Trends in Genetics**, v.9, n.8, p.275-280, 1993.

SCHUSTER, I.; ABDELNOOR, R.V.; MARIN, S.R.R.; CARVALHO, V.P.; KIIHL, R.A.S.; SILVA, J.F.V.; SEDIYAMA, C.S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of a new major QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, n.1, p.91-96, 2001.

SCHUSTER, I.; OLIVEIRA, M.A.R. Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas. In: Carpentieri-Pípolo V. (Ed) **Biotecnologia na agricultura: aplicações e biossegurança**. Cascavel: COODETEC. 392p. 2006.

SCHUMUTZ, J.; CANNON, S.B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, T.; NELSON, W.; HYTEN, D.L.; SONG, Q.; THELEN, J.J.; CHENG, J.; XU, D.; HELLSTEN, U.; MAY, G.D.; YU, Y.; SAKURA, T.; UMEZAWA, T.; BHATTACHARYA, M.K.; SANDHU, D.; VALLIYODAN, B.; LINDQUIST, E.; PETO, M.; GRANT, D.; SHU, S.; GOODSTEIN, D.; BARRY, K.; FUTRELL-GRIGGS, M.; ABERNATHY, B.; DU, J.; THIAN, Z.; ZHU, L.; GILL, N.; JOSHI, T.; LIBAULT, M.; SETHURAMAN, A.; ZANG, X.C.; SHINOZAKI, K.; NQUYEN, H.T.; WING, R.A.; CREGAN, P.; SPECHT, J.; GRIMWOOD, J.; ROKHSAR, D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R.C.; JACKSON, S.A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature** 463:178-183, 2010.

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

SEIXAS, F. **Marcadores Moleculares** Pelotas: UFPel, 2011. 19p.

SHOEMAKER, R.C.; SCHLUETER, J.A.; CREGAN, P.; VODKIN, L. The status of soybean genomics and its role in the development of soybean biotechnologies. **AgBioforum**, v.6, p.4-7, 2003.

SHOEMAKER, R.C.; SPECHT, J.E. Integration of the soybean molecular and classical genetic linkage groups. **Crop Sci**, v.35, p.436-446, 1995.

SHOEMAKER, R.C.; POLZIN, K.; LABATE, J.; SPECHT, J.; BRUMER, E.C.; OLSON, T.; YOUNG, N.; CONCIBIDO, V.; WICOX, J.; TAMULONIS, J.P. Genome duplication in soybean (*Glycine subgenus soja*). **Genetics**, v.144, 329-338. 1996.

SING, R.J.; HYMOWITZ, T. The genomic relationship between *Glycine max* (L.) Merr. and *G. soja* Sieb and Zucc. As revealed by pachytene chromosome analysis. **Theoretical Applied Genetics**, v.76, p.705-711, 1988.

SNPC – Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

SONG, Q.J.; MAREK, L.F.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; CONCIBIDO, V.C.; DELANNAY, X.; SPECHT, J.E.; CREGAN, P.B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical Applied Genetics**, v.109, p. 122-128, 2004.

STÜP, M.; BRACCINI, A.L.; ALBRECHT, L.P.; ÁVILA, M.R.; SCAPIM, C.A.; SCHUSTER, I. Desempenho agrônômico de três cultivares de soja em diferentes épocas em duas safras. **Ciência e Agrotecnologia** 33 1240-1248, 2009.

SWARBRECK D, WILKS, C.; LAMESCH, P.; BERARDINI, T.Z.; GARCIA-HERNANDEZ, M.; FOERSTER, H.; LI, D.; MEYER, T.; MULLER, R.; PLOETZ, L.; RADENBAUGH, A.; SINGH, S.; SWING, V.; TISSIER, C.; ZHANG, P.; HUALA, E. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): Gene structure and function annotation. **Nucleic Acids Research** 36(Database issue):D1009–D1014, 2008.

THOMPSON, J.A.; BERNARD, R.L. A third allele at the soybean dt1 locus. **Crop Sci** 37: 757-762, 1997.

TIAN, Z.; WANG, X.; LEE, R.; LI, Y; SPECHT, J.E.; NELSON, LR; McCLEAN, E.P.; QIU, L.; MA, J. Artificial selection for determinate growth habit in soybean **PNAS** vol 107 8563-8568, 2010.

VERNETTI, F.J. Genética da soja – caracteres qualitativos. In: **Soja, genética e Melhoramento**. Campinas, Fundação Cargill, 1983, vol 2, p.465-723.

VIEIRA, M.L.C.; VELLO, N.A.; SILVA-FILHO, M.C. Genética e Melhoramento Vegetal In: **Genômica/organizador editorial Mir, L.** São Paulo: Editora Ateneu, 2004. P 681-703.

WANG, J.L., Soybean plant stature development in Northeast China. **Soybean Bull.** 1, 5–7. 1996.

WEBB, D.M.; BALTAZAR, B.M.; RAO-ARELLI, A.P. SCHUPP, J.; CLAYTON, K.; KEIM, P.; BEAVIS, W.D. Genetic mapping of soybean cyst nematode race-3 resistance loci in the soybean PI 437654. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, p.574-581, 1995.

XU, B.; ZHEN, H.; LU, Q.; ZHAO, S. Three new evidences of original area of soybean. In: Word Soybean Research Conference, 4, Buenos Aires, 1989. **Proceedings**. Buenos Aires: Association Argentina dela Soja, 1989. P. 124-128.

XUE, N.Y.; LI, W.H.; JIANG, Y.;. The evolution tendency of agronomic characters of soybean cultivars released in Heilongjiang province. **Soybean Sci.** 25, 445-449. 2006.

YANG, W.; WEAVER, D.B.; NIELSEN, B.L.; QIU, J. Molecular mapping of a new gene for resistance to frogeye leaf spot of soya bean in “Peking”. **Plant Breeding**, v.120, n.1, p.73-78, 2001.

YORINORI, J.T.; WILFRIDO, M.P.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F. Ferrugem da soja: identificação e controle. **Embrapa** 204: 15, 2003.

YOUNG, N.D. Cautiously optimistic vision for marker assisted breeding. **Molecular Breeding**, v.5, p.505-510, 1999.

YUAN, J.; NJIT, V.N.; MEKSEM, K.; IQBAL, M.J.; TRIWITAYAKORIN, K.; KSSEM, M.A.; DAVIS, G.T.; SCHIMIDT, M.E.; LIGHTFOOT, D.A. Quantitative trait loci in two soybean recombinant inbred line populations segregating for yield and disease resistance. **Crop Sci**, v.42, p.271-277, 2002.

ZHU, Y.L.; SONG, Q.J.; HYTEN, D.L.; VAN TASSELL, C.P.; MATUKUMALLI, L.K.; GRIMM, D.R.; HYATT, S.M.; FICKUS, E.W.; YOUNG, N.D.; CREGAN, P.B. Single nucleotide polymorphism (SNPs) in soybean. **Genetics**, v.163, p.1123-1134, 2003.

#### 4 ARTIGO1

### MAPEAMENTO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA SELEÇÃO DOS GENES *Dt1* E *Dt2* QUE DETERMINAM TIPO DE CRESCIMENTO DA HASTE DA SOJA

**Resumo:** O tipo de crescimento da haste da soja é característica diferenciadora de cultivares. Os genes *Dt1* e *Dt2* afetam a terminação da haste, haja vista que os tipos de crescimento são classificados em determinado, semideterminado e indeterminado. Até o final do século XX, predominavam cultivares de soja de tipo de crescimento determinado. Atualmente, há preferência por tipo de crescimento indeterminado, principalmente na região centro sul do Brasil. A caracterização fenotípica do tipo de crescimento é complexa e, ocasionalmente, é descrito erroneamente. O objetivo deste trabalho foi mapear e validar marcadores moleculares microssatélite para classificar a soja quanto ao tipo de crescimento, buscando facilitar a descrição de cultivares e a seleção genotípica. Para mapeamento e validação dos marcadores moleculares, foram utilizadas 2 populações F<sub>2:3</sub>: T 117 ( tipo de crescimento semideterminado) x Igra RA 518 RR (tipo de crescimento indeterminado) e CD 235RR (tipo de crescimento determinado) x Igra RA 518 RR. Como o estudo evidenciou, a associação do marcador molecular ao gene *GmTFL1b* foi eficiente na classificação dos tipos de crescimento em soja. O marcador sat\_064 está ligado ao gene *Dt2*, localizado no Grupo de Ligação G do mapa consenso da soja, com frequência de recombinação de 19,4%. Os marcadores moleculares, para os genes *Dt1* e *Dt2*, são eficientes na descrição de genótipos quanto ao tipo de crescimento da haste da soja, bem como para serem utilizados na seleção em programa de melhoramento.

**Palavras-chave** *Glycine max.* Crescimento determinado. Crescimento semideterminado. Crescimento indeterminado. SAM.

## MAPPING AND VALIDATION OF MOLECULAR MARKERS FOR SELECTION OF GENES *Dt1* AND *Dt2* TO DETERMINE TYPE OF STEM GROWTH OF SOYBEAN

**Abstract:** The type of stem growth of soybean is a distinguishing feature of cultivars. The genes, *Dt1* and *Dt2* affect the termination of the stem, and the types of growth are classified in determinate, semi-determinate and indeterminate. Until the end of the twentieth century predominated soybean of determinate growth type. Currently there are preferences for indeterminate type of growth mainly in the central southern Brazil. Phenotypic characterization of the type of growth is complex and is sometimes erroneously described. The objective of this study was to map and validate molecular markers to classify the type of soybean growth, seeking to facilitate the description of cultivars and genotypic selection. For mapping and validation of molecular markers used were two populations F<sub>2:3</sub>: T 117 (semi-determinate growth type) x Igra RA 518 RR (indeterminate growth type) and CD 235RR (determinate growth type) x Igra RA 518 RR. The study has shown that the association of the molecular marker to the gene *GmTFL1b* was efficient in the classification of growth types in soybean. The marker sat\_064 is connected to the *Dt2* gene, which is located in the Liaison Group G of the consensus map of soybeans with recombination frequency of 19.4%. Molecular markers for genes *Dt1* and *Dt2* were efficient in describing the genotypes of soybean stem growth, as well as, for the use in the selection of a breeding program.

**Key Words** *Glycine max*. Determinate growth. Semi-determinate growth. Indeterminate growth. SAM.

### 4.1 INTRODUÇÃO

O tipo de crescimento da haste da soja [*Glycine max* (L.) Merr.] influencia várias características agrônômicas. Plantas com tipo de crescimento determinado, geralmente atingem alturas menores com maior resistência ao acamamento, menores alturas da inserção da primeira vagem e maior número de ramos por planta do que cultivares de tipo de crescimento indeterminado de grupo de maturidade semelhante. Linhagens de tipo determinado também apresentam menor período de floração do que linhagens de tipo indeterminado (BERNARD, 1972; KILGORE-NORQUEST & SNELLER, 2000).

Dois genes, *Dt1* e *Dt2*, afetam a terminação da haste em soja (BERNARD, 1972). Um alelo recessivo, *dt1*, e um alelo dominante, *Dt2*, apressam o término do crescimento apical da haste, o que diminui a altura da planta e número de nós. Desses, *dt1* tem um efeito muito maior. BERNARD (1972) observou um fenótipo, intermediário semideterminado, distinto dos fenótipos indeterminado e determinado em populações híbridas entre as linhas indeterminadas e determinadas. Essas plantas semideterminadas segregaram para tipos

indeterminado e determinado, indicando que *Dt1* se comportou como um gene parcialmente dominante na base genética testada.

O tipo de crescimento, ocasionalmente, foi classificado erroneamente (BERNARD, 1972). Essa dificuldade de seleção — descrição e a tendência de se utilizar com maior frequência cultivares indeterminadas e semideterminadas nos programas de melhoramento — amplia de forma progressiva. O tipo de crescimento é uma característica diferenciadora de cultivares de soja e faz parte das exigências mínimas da UPOV (União Internacional para a Proteção de Novas Variedades de Plantas) como descritor das cultivares para fins de proteção da propriedade intelectual. Nesse aspecto, consideram-se os tipos de crescimento determinado, semideterminado e indeterminado. (SNPC, 2012).

Ademais, a caracterização assistida por marcadores moleculares (SAM) apresenta-se como uma ferramenta de grande auxílio no desenvolvimento rápido e eficiente de cultivares (SCHUSTER et al., 2006). Enquanto que a base molecular do tipo de crescimento foi dissecada por LIU et al., 2010. A partir do genoma da soja e análise de mapeamento, sugeriram que o gene *Dt<sub>1</sub>* codifica a proteína GmTFL1b e que o tipo de crescimento da haste da soja é determinado pela variação deste gene. O gene *Dt1* foi mapeado com marcadores moleculares no GL L (TIAN et al., 2010; CREGAN et al., 1999; LIU et al., 2007), e o gene *Dt2* foi mapeado no GL G (MUEHLBAUER et al., 1989; CREGAN et al., 1999), que agora são designados cromossomo 19 e 18, respectivamente (SCHMUTZ et al., 2010).

No início do século XXI, 93% das cultivares de soja protegidas no Brasil eram de tipo de crescimento determinado (BRASIL, 2002). No ano agrícola de 2010/2011, entre as dez cultivares de soja mais semeadas, metade apresentou o tipo de crescimento indeterminado; e outra metade, determinado, visto que, na região Sul do país, as cinco cultivares mais semeadas foram as cultivares de tipo de crescimento indeterminado (KLEFFMANN & PARTNER, 2011). Diante dessa realidade, os agricultores brasileiros estão mudando sua preferência de tipo de crescimento, além de programas de melhoramento visando atender a demanda enfrentam a necessidade de seleção, descrição e distinção dos tipos de crescimento determinado, semideterminado e indeterminado. No entanto, durante o processo de separação dos três fenótipos, há dificuldade na seleção e na descrição.

Em virtude dessa impossibilidade, o presente trabalho objetiva mapear e validar marcadores moleculares para classificar a soja quanto ao tipo de

crescimento, buscando facilitar a descrição de cultivares e a seleção dentro de um programa de melhoramento genético.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Material Genético

Para mapeamento e validação dos marcadores moleculares, foram obtidas duas populações  $F_{2:3}$ , conforme descrição abaixo.

- População 1: Como parental feminino, foi utilizada a cultivar T 117 (Bernard, 1972) que possui o genótipo  $Dt1Dt1Dt2Dt2$  (fenótipo com tipo de crescimento semideterminado). O parental masculino foi cultivar Igra RA 518 RR (Igra, 2011) que possui o genótipo  $Dt1Dt1dt2dt2$  (fenótipo com tipo de crescimento indeterminado).

População 2: Como parental feminino foi utilizada a cultivar CD 235RR que possui o genótipo  $dt1dt1dt2dt2$  (fenótipo com tipo de crescimento determinado). Como parental masculino, foi utilizada a cultivar Igra RA 518RR que possui o genótipo  $Dt1Dt1dt2dt2$  (fenótipo com tipo de crescimento indeterminado).

As hibridações foram realizadas em casa de vegetação no verão 2008/2009. Porém, o avanço de geração das plantas  $F_1$  foi realizado em casa de vegetação no outono e inverno do ano de 2009 e as plantas  $F_2$  foram conduzidas a campo no verão 2009/2010. As plantas  $F_2$  foram colhidas e trilhadas individualmente, obtendo-se sementes ( $F_{2:3}$ ). As sementes de cada planta  $F_2$  compuseram uma família  $F_{2:3}$ . Estas foram identificadas com o número de origem da planta  $F_2$ . Para a semeadura das famílias  $F_{2:3}$  de cada população, foram preparadas 60 sementes para cada linha, o restante das sementes foi utilizado nas análises moleculares.

### 4.2.2 Avaliação Fenotípica

O experimento foi semeado na safra 2010/2011, no centro de pesquisa da COODETEC – Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, em Cascavel/PR (Latitude S 24° 52' 56,9"; Longitude W 53° 32' 00,4" e altitude 690m) e tipo de solo Latossolo Roxo Distroférico. As linhas  $F_{2:3}$ , e cultivares foram semeadas

em linhas individualizadas de 4 metros de comprimento, no espaçamento de 0,45 m entre linhas. Para um melhor resultado, a adubação e o controle de plantas daninhas, pragas e doenças foram efetuados conforme as exigências técnicas para a cultura. Já a avaliação fenotípica do tipo de crescimento da haste das populações de estudo e testemunha foi realizada quando as plantas estavam em maturação (estádio R8; FERHR et al., 1971).

#### 4.2.3 Extração de DNA

Para o estudo, utilizaram-se dez sementes de cada família  $F_{2:3}$  para extração de DNA e, em seguida, moídas para obtenção de um pó fino.

A extração de DNA das sementes de cada cultivar e família  $F_{2:3}$  foi realizada conforme o protocolo descrito por McDONALD et al. (1994), com algumas modificações (SCHUSTER et al., 2004). Cerca de 50 mg de sementes foram colocadas em micro tubos com capacidade para 1,5 mL. Posteriormente, adicionaram-se 500  $\mu$ L de tampão de extração contendo 200mM de Tris HCl (pH 7,5), 25mM de EDTA, 288 mM de NaCl e 0,5% de SDS . Para uma maceração mais precisa, uma esfera de vidro de 3 mm de diâmetro foi adicionada em cada tudo, e, então, agitados em um grinder para macerar o tecido vegetal. Após três minutos de agitação, acrescentaram-se 500  $\mu$ L do tampão de extração, seguido de centrifugação a 14.000 rpm, por 10 minutos. Depois desse processo, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e 10  $\mu$ L de proteinase K (10 mg mL<sup>-1</sup>) foi adicionado para remoção das proteínas. As amostras foram colocadas em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Para precipitar o DNA, adicionaram-se 500  $\mu$ L de isopropanol gelado e, após dois minutos de repouso, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado deixado em temperatura ambiente por 15 minutos para secagem. Para a eliminação do RNA, o precipitado foi ressuspensionado com 300  $\mu$ L de TE (Tris HCl pH 7,5 e 5 M EDTA) contendo 40  $\mu$ g. uL<sup>-1</sup> de RNase A (10 mg.mL<sup>-1</sup>). Colocadas as amostras em banho-maria a 37 °C por 30 minutos, o DNA foi novamente precipitado pela adição de 500  $\mu$ L de isopropanol gelado, e, após dois minutos, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado deixado por 15 minutos em temperatura ambiente para secagem. Após esse período, 300  $\mu$ L de TE foram adicionados para ressuspender o precipitado.

Diante disso, a concentração de DNA de cada amostra foi estimada em espectrofotômetro Nanodrop1000 por absorvância a 260 nm, uma vez que cada unidade de absorvância correspondente à concentração de 50 µg mL<sup>-1</sup> de DNA de fita dupla (SAMBROOK et al., 1989). O DNA foi diluído em TE para a concentração de trabalho de 6 ng uL<sup>-1</sup>, a partir da solução concentrada de cada amostra.

A qualidade do DNA foi avaliada em gel de agarose 0,8% contendo 0,02 µL mL<sup>-1</sup> de brometo de etídio.

#### 4.2.4 Amplificação do Gene *Dt1*

Para a amplificação específica do gene *Dt1* foram utilizados os primers *TFL1b-pro-F*: 5'-CCATGCTTAATCGGCATCACT-3' e *TFL1b-pro-R*: 5'-GGTGGTGGCATAGTTTAATT-3' que geram um fragmento de 410 pb (pares de bases), desenhados para SNP no promotor do gene *Dt1* (LIU et al., 2010). Para validar a eficiência deste marcador, foram utilizadas testemunhas com tipo de crescimento determinado e indeterminado. Posteriormente, o marcador foi aplicado nas duas populações CD 235RR x Igra RA 518 RR (145 linhas F<sub>2:3</sub>) e T117 x Igra RA 518RR (90 linhas F<sub>2:3</sub>).

Nas reações de PCR, adicionaram-se 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão 1x (50 µM Tris, 10 µM HCl), 300 µM de dNTPs, 0,2 µM de cada primer (senso e antisenso), 1 unidade de Taq DNA Polimerase, 50 ng de DNA em um volume final de 20 µL. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems), programado a 94 °C por 5 min, seguido por 45 ciclos a 94 °C por 1 min., 55°C por 1 min., 72 °C por 1 min. e extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e revelado sob luz ultravioleta em aparelho de foto documentação Vilber Lourmat (Marne La Valle, FR).

Em seguida, 10µL dos produtos obtidos da PCR foram submetidos à digestão com a enzima *NdeI* (New England), conforme as instruções do fabricante. A reação foi mantida no banho-maria a 37°C por 3 horas e 50 min e, em seguida, submetida à eletroforese em gel de agarose 2%.

#### 4.2.5 Mapeamento do Gene *Dt2*

O DNA foi extraído de dez amostras com tipo de crescimento semideterminado e dez amostras de tipo indeterminado, derivadas da hibridação entre T117 e Igra RA518 RR, todas contendo o gene *Dt1*. A amostra era composta de 10 sementes de cada linha  $F_{2:3}$ . De cada tipo de crescimento, foram feitos dois bulks de DNA, com cinco amostras cada, e utilizados como padrões às cultivares T117 (semideterminada *Dt2Dt2*) e Igra RA518 RR (indeterminada *dt2dt2*).

Para obtenção de marcadores candidatos para seleção do gene *Dt2*, utilizaram-se dez *primers* microssatélites do grupo de ligação G da soja (cromossomo 18) (Sat\_038, Sat\_064, Sat\_168, Sat\_358, Satt070, Satt115, Satt130, Satt288, Satt340, Satt372) (CREGAN, et al., 1999). As amostras de DNA foram amplificadas nas condições de PCR, já descritas anteriormente e visualizadas em gel de agarose 2%.

Os *primers* que apresentaram polimorfismo entre os bulks de DNA de tipo de crescimento contrastantes foram considerados candidatos, e utilizados para amplificação das dez amostras de cada tipo de crescimento que formaram os bulks, individualmente.

As reações de PCR realizaram-se em termociclador Veriti (Applied Biosystems), programado a 94 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 30 seg., 55°C por 30 seg., 72 °C por 45 seg. e extensão final a 72 °C por 20 min. Os produtos da amplificação foram corados com tampão de carregamento (azul de bromofenol) e submetidos à desnaturação a 95° por 4 minutos. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante e corados com Nitrato de prata 0,1% para visualização dos fragmentos.

#### 4.2.6 Avaliação da Eficiência da Seleção com Marcador Molecular para Tipo de Crescimento em Soja

Para validação do marcador candidato, este foi aplicado nas populações derivadas dos cruzamentos entre CD 235RR x Igra RA 518 RR e T117 x Igra RA 518 RR. Como avaliação, 145 e 90 linhas  $F_{2:3}$  de cada cruzamento, respectivamente. A associação do marcador com o fenótipo foi avaliado através do

teste de  $\chi^2$  a partir de tabelas de contingência, contendo dados fenotípicos e moleculares. A análise ocorreu por meio do Programa Genes (CRUZ, 2006).

Na população derivada do cruzamento CD 235RR x Igra RA 518 RR, avaliou-se a eficiência da seleção com marcador para o gene *Dt1*, já que houve segregação apenas para este gene. Na população obtida do cruzamento T117 x Igra RA 518 RR, foi avaliada eficiência para o marcador do gene *Dt2*, pois esta população segregou apenas para este gene.

Com os dados obtidos a partir do cruzamento T117 x Igra RA 518 RR, calculou-se a frequência de recombinação do marcador utilizando o Programa GQMOL (CRUZ & SCHUSTER, 2006). Foram utilizados os parâmetros de população  $F_2$  com marcadores codominantes e método de estimação da máxima verossimilhança analítico com LOD score mínimo de 3.0 para a significância de recombinação.

#### 4.2.7 Avaliação de Cultivares com Marcadores para Genes *Dt1* e *Dt2*

O DNA de 22 cultivares de soja foi extraído de acordo com McDONALD et al., 1994 com modificações (SCHUSTER et al., 2004). Também foi extraído DNA de amostra de sementes de quatro plantas individuais de cada cultivar que apresentou mais que uma vagem no ápice da haste, com a hipótese de que estas plantas poderiam ter o gene *Dt2* ou ser heterozigotas para o gene *Dt1*. No total, foram 36 amostras, que estão identificadas na tabela 3, amplificadas com marcadores para os genes *Dt1* e *Dt2*. As informações fenotípicas do tipo de crescimento da haste, contidas na tabela 3, são as descritas pelos obtentores das respectivas cultivares. As amostras foram amplificadas com os marcadores para o gene *Dt1* e *Dt2*, conforme descrito anteriormente.

**Tabela 3** Cultivares de soja e seus respectivos fenótipos de tipo de crescimento da haste descritos pelos obtentores.

Genótipo	Fenótipo	
	Tipo de Crescimento	Fonte
CD 201	determinado	COODETEC, 2006
TP 50981 (T117 x Igra RA 518 RR) <sup>1</sup>	semideterminado	Germoplasma COODETEC
NK412113	indeterminado	RPSRCB, 2003
BRS 283	indeterminado	EMBRAPA, 2010).
CD 207	determinado	COODETEC, 2006
CD 2630RR	indeterminado	COODETEC, 2013
CD 204	determinado	COODETEC, 2006
FTS CAMPO MOURÃO RR	semideterminado	FTS Sementes, 2013
CD 202	determinado	COODEC, 2006
BMX Apolo RR	indeterminado	BRASMAX, 2013
CD 203	determinado	COODETEC, 2006
ANTA 82	semideterminado	TMG, 2013
NK 7059RR	indeterminado	Sygenta Seeds, 2013
CD 219RR	determinado	COODETEC, 2006
BMX Ativa RR	determinado	BRASMAX, 2013
GB 874RR	determinado	Girassol Agrícola, 2013
CD 211	determinado	COODETEC, 2006
CD 206RR	determinado	COODETEC, 2011
NK 7059RR	indeterminado <sup>2</sup>	Sygenta Seeds, 2013
NK 7059RR	indeterminado <sup>2</sup>	Sygenta Seeds, 2013
NK 7059RR	indeterminado <sup>2</sup>	Sygenta Seeds, 2013
NK 7059RR	indeterminado <sup>2</sup>	Sygenta Seeds, 2013
BMX Apolo RR	indeterminado <sup>2</sup>	BRASMAX, 2013
BMX Apolo RR	indeterminado <sup>2</sup>	BRASMAX, 2013
BMX Apolo RR	indeterminado <sup>2</sup>	BRASMAX, 2013
BMX Apolo RR	indeterminado <sup>2</sup>	BRASMAX, 2013
NA 5909RR	indeterminado <sup>2</sup>	Nideira Sementes, 2013
NA 5909RR	indeterminado <sup>2</sup>	Nideira Sementes, 2013
NA 5909RR	indeterminado <sup>2</sup>	Nideira Sementes, 2013
NA 5909RR	Indeterminado <sup>2</sup>	Nideira Sementes, 2013
BMX POTENCIA RR	Indeterminado <sup>2</sup>	BRASMAX, 2013
BMX POTENCIA RR	Indeterminado <sup>2</sup>	BRASMAX, 2013
BMX POTENCIA RR	Indeterminado <sup>2</sup>	BRASMAX, 2013
BMX POTENCIA RR	Indeterminado <sup>2</sup>	BRASMAX, 2013
T117	semideterminado	BERNARD, 1972
Igra 518 RR	Indeterminado	Igra, 2013

<sup>1</sup> Linhagem experimental

<sup>2</sup> Planta com mais de uma vagem no ápice da haste

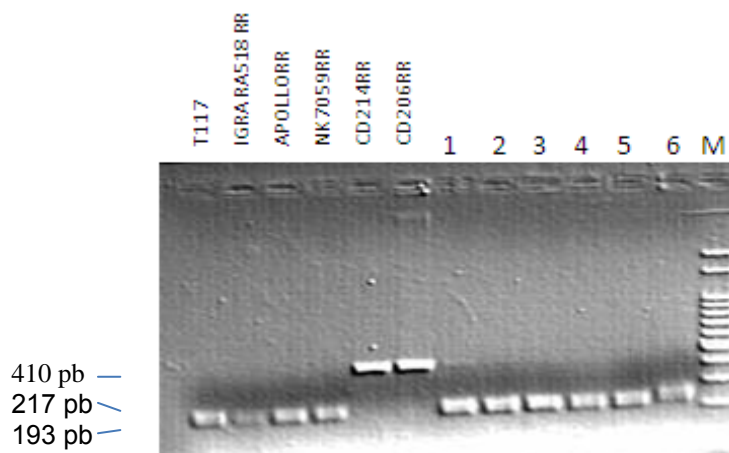
#### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para validar a seleção com marcador molecular para o gene *Dt1* em soja, utilizaram-se os *primers* *TFL1b-pro-F* e *TFL1b-pro-R* (Liu, et. al., 2010). Estes *primers* amplificam um fragmento de 410 pb de DNA genômico de linhas determinadas e indeterminadas. Somente os fragmentos que amplificam o alelo *Dt1* são digeridos em fragmentos de 217 e 193 pb com enzima *NdeI*.

Constatou-se, portanto, que as plantas avaliadas (Figura 1) apresentaram o perfil de DNA esperado, já que é conhecido que as cultivares T117,

Igra RA 518 RR, BMX Apolo RR, NK 7059RR e as plantas 1 a 6 apresentam o genótipo *Dt1Dt1*, e as cultivares CD 214RR, CD 206RR apresentam tipo de crescimento determinado e genótipo *dt1dt1*.

**Figura 1** Amplificação da amplificação com marcador GmTFL1b-pro e digestão com enzima *NdeI*. Planta com tipo de crescimento semideterminado T117 e plantas com tipo de crescimento indeterminado: Igra RA 518 RR, BMX Apolo RR, NK 7059 RR; Plantas com tipo de crescimento determinado: CD 214RR, CD 206RR; 1 a 6 são plantas da população obtida a partir do cruzamento T117 x Igra RA 518 RR cujo fenótipo é indeterminado; M: Marcador de peso molecular de 100 pb.



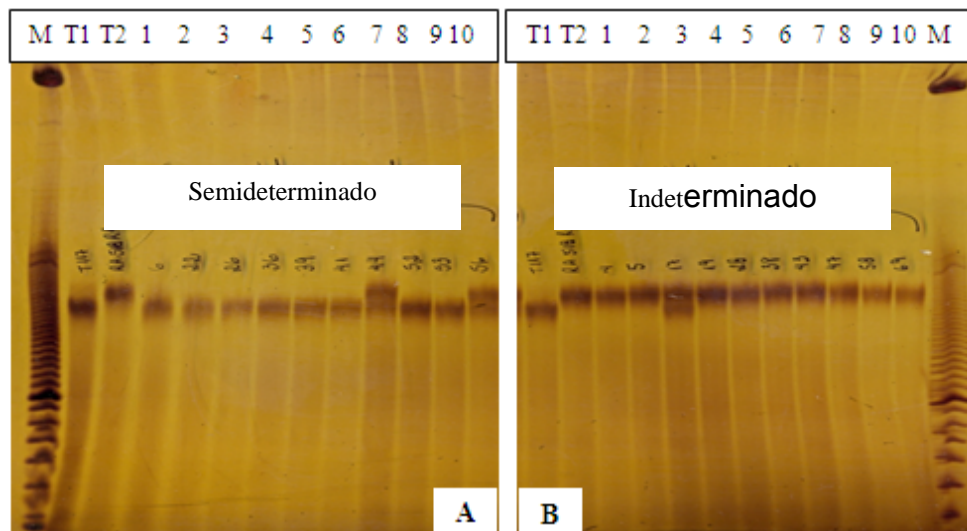
A base molecular do tipo de crescimento foi determinada por Liu et al. (2010). Os autores isolaram dois ortólogos de ervilha (*Pisum sativum*), *GmTFL1a* e *GmTFL1b*, e, a partir do genoma da soja e análise de mapeamento, sugeriram que o gene *Dt1* codifica a proteína *GmTFL1b* e que o tipo de crescimento da haste da soja é determinado pela variação deste gene.

O genótipo *dt1dt1* é responsável pelo tipo de crescimento determinado, e o genótipo *Dt1Dt1* pelo tipo de crescimento indeterminado, enquanto *Dt1dt1* expressa fenótipo semideterminado (BERNARD, 1972).

Os bulks contrastantes foram amplificados e o marcador — considerado candidato — foi o sat\_064, que apresentou polimorfismo entre os bulks e consistência com os resultados dos parentais.

O marcador sat\_064 foi utilizado para amplificar todas as plantas que formavam os bulks, individualmente (figura 2). Por meio desse processo, observou-se uma possível segregação entre as amostras.

**Figura 2** Amplificação com marcador sat\_064. M: Marcador de peso molecular de 100 pb; T1: Testemunha 1 - Cultivar T117 que apresenta tipo de crescimento semideterminado, conferido pelo gene *Dt2*; T2: Testemunha 2 - Cultivar Igra RA 518 RR, que apresenta tipo de crescimento indeterminado, não possui o gene *Dt2*; A: Plantas com tipo de crescimento semideterminado, derivadas do cruzamento T117 x Igra RA 518 RR; B: Plantas com tipo de crescimento indeterminado, derivadas do cruzamento T117 x Igra RA 518 RR.



Todas as plantas, derivadas dos cruzamentos CD 235RR x Igra RA 518 RR e T117 x Igra RA 518 RR, foram analisadas com marcador molecular para genes *Dt1* e *Dt2*.

O teste de associação, entre os dados fenotípicos e moleculares obtidos da população CD 235RR x Igra RA 518 RR, foi significativo, ou seja, os dados fenotípicos e moleculares não são independentes (Tabela 4). Contudo, analisaram-se alguns resultados diferentes entre a avaliação fenotípica e molecular. Tal fato não era esperado, uma vez que o marcador utilizado está dentro do gene, na região promotora, e, por isso, não haveria risco algum de recombinação genética. Nas avaliações de campo, houve certa dificuldade, em alguns casos, em distinguir as plantas quanto ao tipo de crescimento a partir do fenótipo, e isso tem ocorrido, como resultado, classificações errôneas. Neste caso, atribuímos as inconsistências observadas aos erros na determinação do fenótipo e podemos considerar o marcador utilizado uma ferramenta muito eficiente para evitar estes erros.

**Tabela 4** Tabela de contingência com dados moleculares e fenotípicos obtidos nas análises realizadas na população F<sub>2:3</sub> da população CD 235RR e Igra RA 518 RR.

		Análise Molecular			Total
		Determinado	Segregando <i>Dt1</i>	Indeterminado	
Análise fenotípica	CD 235RR x Igra RA 518 RR				
	Determinado	23	3	0	26
	Segregando <i>Dt1</i>	5	52	5	62
	Indeterminado	5	16	36	57
Total		33	71	41	145

$$(\chi^2 = 128,88; GL=4; P(\%)=0,001)$$

O obtentor da cultivar CD 235RR descreveu seu tipo de crescimento da haste como semideterminado (COODETEC, 2011). Neste caso, esta cultivar deveria ter o genótipo *Dt1Dt1 Dt2Dt2*, e no cruzamento com 'Igra RA 518 RR' não deveria segregar para o gene *Dt1*. Como resultado, não deveriam ser observadas linhagens determinadas na descendência deste cruzamento. Os resultados da avaliação dos descendentes da hibridação CD 235RR x Igra RA 518 RR resultaram em plantas F<sub>2</sub> determinadas, indeterminadas e semideterminadas (que segregaram na geração F<sub>3</sub>). Com estes resultados, concluímos que a cultivar CD 235RR apresenta genótipo *dt1dt1*, e tipo de crescimento determinado.

Na descendência do cruzamento T117 x Igra RA 518 RR, esperamos encontrar 100% das plantas homozigotas para o gene *Dt1*, já que os dois parentais (T117 e Igra RA 518 RR) apresentam este gene. Todas as plantas analisadas apresentaram o gene *Dt1* na avaliação molecular, o que confirma a eficiência do marcador molecular utilizado. Ainda, nenhuma planta foi classificada como tipo determinado, na análise fenotípica.

Dois tipos de crescimento eram esperados na descendência do cruzamento T117 x Igra RA 518 RR: indeterminado e semideterminado. A cultivar T117 apresenta o gene *Dt2*, e tipo de crescimento semideterminado e a cultivar Igra RA 518 RR, tipo indeterminado.

Para cultivares de crescimento determinado e semideterminado, a gema terminal transforma-se em uma inflorescência terminal; enquanto, para cultivares de crescimento indeterminado, esta não se forma, e o caule continua a se desenvolver, mesmo após o início do florescimento (MÜLLER, 1981). De modo geral, as cultivares são caracterizadas como do tipo determinado e, raramente, como semideterminado.

A análise de associação entre os dados fenotípicos e moleculares, obtidos da população T117 x Igra RA 518 RR, também foi altamente significativa e a distribuição entre dados fenotípicos e moleculares não foi independente (Tabela 5). Isso significa que o marcador sat\_064 está ligado ao gene *Dt2*.

**Tabela 5** Tabela de contingência com dados moleculares e fenotípicos obtidos nas análises realizadas na população F<sub>2:3</sub> do cruzamento T117 e Igra RA 518 RR.

		Análise Molecular			Total
		T117 x Igra RA 518 RR	Semideterminado	Indeterminado	
Análise fenotípica	Semideterminado	13	2	8	23
	Indeterminado	0	12	4	16
	Segregando <i>Dt2</i>	7	8	36	51
Total		20	22	48	90

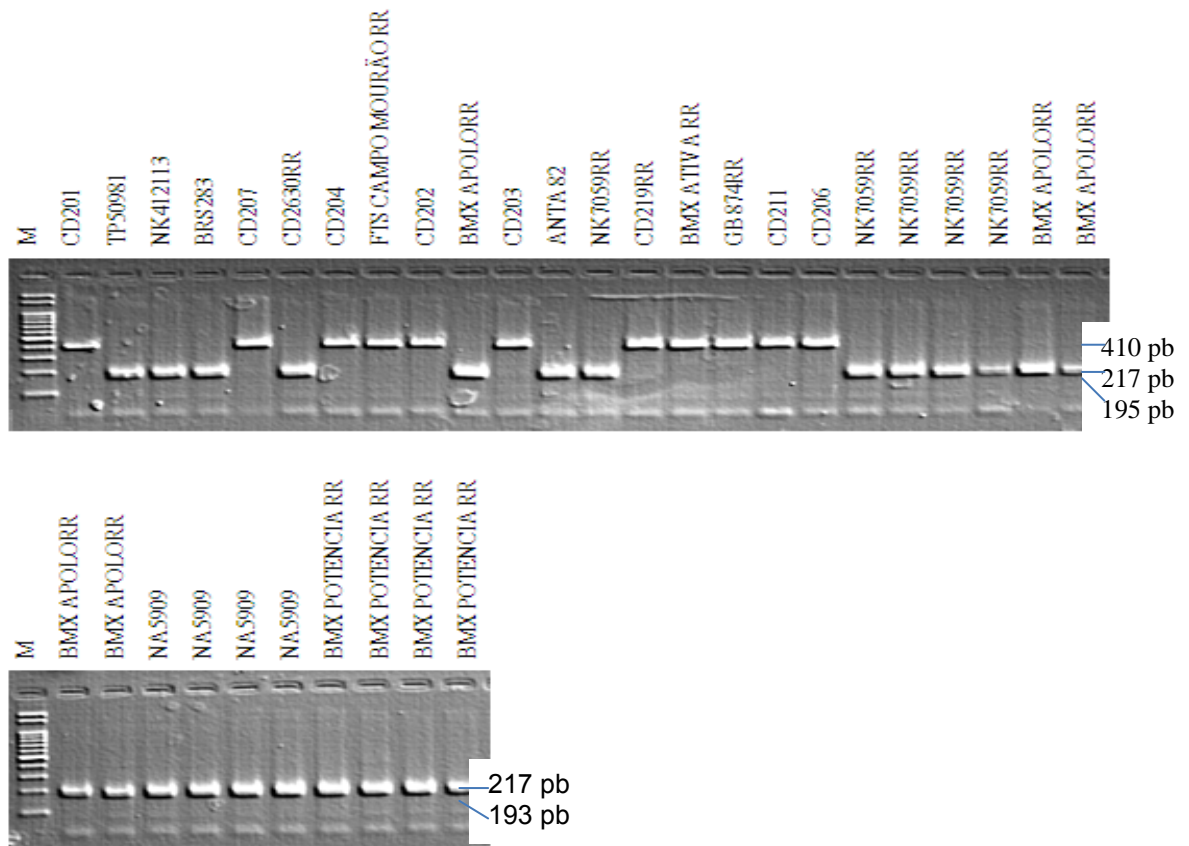
$$(\chi^2 = 44,79; GL=4; P(\%)=0,001)$$

A frequência de recombinação obtida entre o marcador sat\_064 e o gene *Dt2* foi de 19,4%, com LOD score 8,19. Possivelmente, esta estimativa foi mais alta do que a real frequência de recombinação entre o gene e o marcador, devido à dificuldade em classificar as plantas fenotipicamente como tipo semideterminado. De acordo com o trabalho de BERNARD (1972), os testes de progênie, ocasionalmente, mostraram que plantas semideterminadas ou indeterminadas foram classificadas erroneamente. Constata-se na tabela 3, o maior número de erros entre dados moleculares e fenotípicos nas classes em que temos classificação fenotípica, tipo semideterminado e segregando.

Para avaliar a eficiência dos marcadores, foram avaliadas 22 variedades de soja com os marcadores para o gene *Dt1* e *Dt2*.

Pode ser identificado, na figura 3, que todos os materiais corresponderam com o descrito pelos obtentores (Tabela 3) em relação ao genótipo presença ou ausência do gene *Dt1*, exceto a cultivar FTS Campo Mourão RR, a qual o obtentor descreve como de tipo de crescimento semideterminado, porém, o gene *Dt1* não está presente neste genótipo.

**Figura 3** Amplificação do DNA de cultivares de soja, utilizando o marcador GmTFL1b-pro e digestão com enzima *Nde*I. M: Marcador de peso molecular de 100 pb.



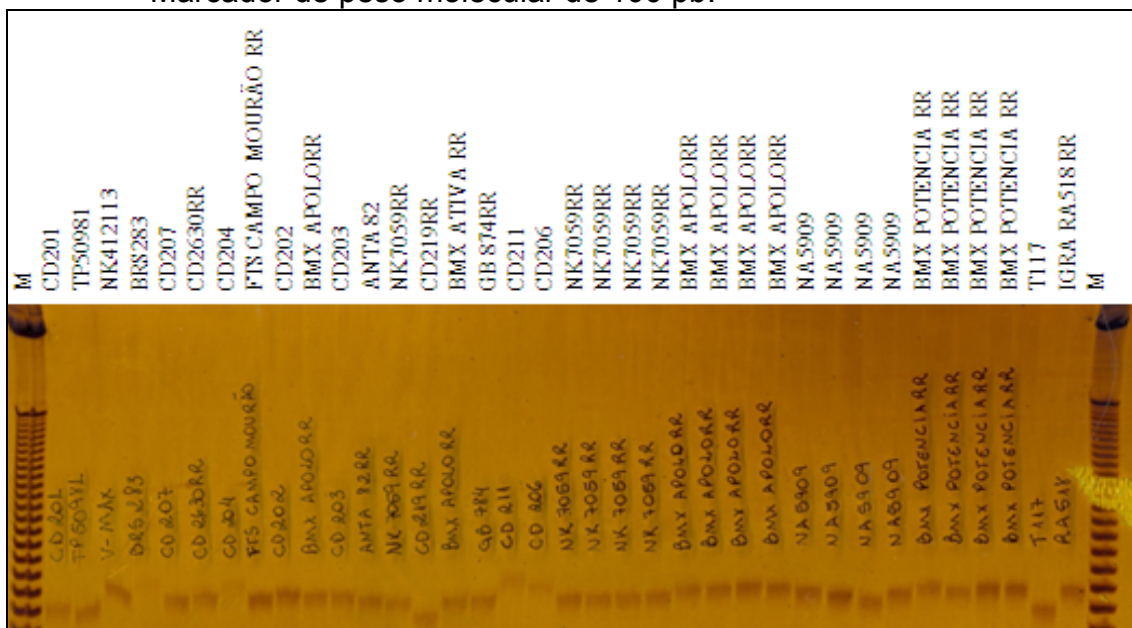
Na figura 4, observa-se que todos os genótipos corresponderam com o descrito pelos obtentores (Tabela 3), exceto as cultivares FTS Campo Mourão RR o qual o obtentor descreve como de tipo de crescimento semideterminado e, neste caso, o gene *Dt2* não está presente. Também a cultivar Anta 82, na análise molecular, não apresentou o gene *Dt2*, divergindo do descrito pelo obtentor que classifica esta cultivar como de tipo semideterminado e, para isto, o genótipo deveria ter o gene *Dt2*. Em relação aos cultivares NK 7059RR, BMX Apolo RR, BMX Potencia RR e NA 5909RR que apresentavam planta com mais de uma vagem no ápice da haste. Nas quatro análises de planta individual de cada cultivar, não confirmou a presença do gene *Dt2*, validando e confirmando as informações dos obtentores em que estas cultivares são homogêneas em relação à ausência do gene *Dt2*.

A cultivar FTS Campo Mourão RR, pelos resultados obtidos, tem o genótipo *dt1dt1dt2dt2*, ou seja, é de tipo de crescimento determinado, divergindo do

descrito pelo obtentor como de tipo de crescimento semideterminado, ou seja, genótipo *Dt1Dt1Dt2Dt2*.

‘Anta 82’, descrita como de tipo de crescimento semideterminado, evidenciou pelas análises, utilizando os marcadores moleculares para os genes *Dt1* e *Dt2*, presença do gene *Dt1* e ausência do gene *Dt2*, ou seja, esta cultivar apresenta genótipo que confere fenótipo tipo de crescimento indeterminado. Isso é corroborado com informações obtidas no ano de 2011 e não publicadas pela COODETEC: hibridações da cultivar Anta 82 — como parental feminino e parentais masculinos CD 216 e M-SOY 6101 com tipo de crescimento indeterminado — originaram populações F<sub>2</sub>, nas quais todas as plantas apresentavam tipo de crescimento indeterminado, demonstrando que, de fato, ‘Anta 82’ é de tipo de crescimento indeterminada.

**Figura 4** Amplificação do DNA de cultivares de soja com marcador sat\_064. M: Marcador de peso molecular de 100 pb.



As cultivares CD 201 e CD 219RR apresentaram ausência do gene *Dt1* e presença do gene *Dt2*. Este genótipo confere tipo de crescimento determinado e confirma a descrição do obtentor. A CD 201 tem como parentais OC 4-Iguaçu\*5; e W20. A ‘CD 219RR’, como parentais ‘OC 94-2062’ e ‘CO 2131’. O progenitor CO 2131 tem o gene CP4-EPSPS, que da tolerância ao glifosato (RPRCB, 2005). Isso é corroborado com informações não publicadas pela COODETEC, a linhagem OC 94-2062 foi a que deu origem a cultivar CD 211 e esta, na análise, mostrou o genótipo

como *dt1dt1dt2dt2*. A origem provável do gene *Dt2*, na cultivar CD 219RR, foi do ‘CO 2131’ que se configura um cruzamento entre [OC 95-3585 X OC 95(4)-3355 X H 5566RR], baseado nestas genealogias, em que OC 95-3585 e OC 95(4)-3355 são linhagens irmãs da OC 95(4)-2422, responsável pela origem da cultivar CD 201. Provavelmente, a origem do gene *Dt2*, nas cultivares CD 201 e CD 219RR, seja o ancestral comum Ocepar 4- Iguaçu.

#### 4.4 CONCLUSÕES

A associação do marcador molecular ao gene *GmTFL1b* foi altamente eficiente na classificação dos tipos de crescimento em soja.

O marcador sat\_064 está ligado ao gene *Dt2*, localizado no Grupo de Ligação G do mapa consenso da soja, com frequência de recombinação de 19,4%.

Os marcadores moleculares, para os genes *Dt1* e *Dt2*, são eficientes na descrição de genótipos quanto ao tipo de crescimento da haste da soja, para serem utilizados na seleção em programa de melhoramento.

#### 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERNARD, R.L. Two genes affecting stem termination in soybean. **Crop Sci** 12: 235-239, 1972.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. **Catálogo de cultivares protegidas de soja (*Glycine max.* (L.) Merrill)**. Brasília, 2002. 133p.

BRAXMAX **Produtos 2012 – Região Sul**. Londrina: Braxmax Genética Ltda, 2011. 21p.

CREGAN, P.B.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, A.L.; KAYA, N.; VAN TOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, J.; SPECHT, J.E. An Integrated Genetic Linkage Map of the Soybean Genome. **Crop Sci**, 39: 1464–1490, 1999.

COODETEC **Guia de Produtos 2006**. Cascavel: Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, 2006, 127p.

COODETEC **Guia de Produtos Sul – Trigo, Soja, Milho 2011**. Cascavel: Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola. 2011, 85p.

COODETEC **Catálogo de Produtos 2013 Brasil – Sul e Paraguai**. Cascavel: Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola. 2013, 4p.

CRUZ, C.D. **Programa GENES**: aplicativo computacional em genética e estatística experimental. Viçosa, MG: UFV, 2006. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm>>. Acesso em: novembro 2012.

CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos. Versão 9.1. Viçosa, MG: UFV, 2006. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>>. Acesso em: novembro, 2012.

EMBRAPA SOJA: Fundação Meridional **Cultivares de Soja – Regiões Sul e Central do Brasil 2010/2011**, 2010. 60p.

FEHR, WR, CAVINESS CE, BURMOOD DT, PENNINGTON JS (1971) Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merril. **Crop Sci** 11:929-931

FT SEMENTES **FTS Campo Mourão RR** Disponível em <<http://www.ftsementes.com.br/catalogo.php>>. Acesso em 07/01/2013.

GIRASSOL AGRÍCOLA **GB 874RR** Disponível em <[http://www.girassolagrica.com.br/?page\\_id=825](http://www.girassolagrica.com.br/?page_id=825)>. Acesso em: 09/01/2013.

Igra Sementes **Igra RA 518RR** Disponível em:<<http://www.igrasementes.com>>. Acesso em: 07/01/2013.

KILGORE-NORQUEST, L.; SNELLER, C.H. Effect of stem termination on soybean traits in southern U.S production systems. **Crop Sci** 40: 83-90, 2000.

KLEFFMANN e PARTNER comércio e assessoria mercadológica e representação. **Amis seed soybean 2010/2011**, 2011. <<http://www.kleffmann.com.br>>

LIU, B.; WATANABE, S.; UCHIYAMA, T.; KONG, F.; KANAZAWA, A.; XIA, Z.; NAGAMATSU, A.; ARAI, M.; YAMADA, T.; KITAMURA, K.; MASUTA, C.; HARADA, K.; ABE, J. The soybean stem growth habit gene *Dt1* is an ortholog of Arabidopsis *TERMINAL FLOWER1*. **Plant Physiol** 153: 198-210, 2010.

McDONALD, M.D.; ELLIOT, L.J.; SWEENEY, P.A. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 22, n. 1, p.171-176, 1994.

MUEHLBAUER, G.J.; STASWICK, P.E.; SPECHT, J.E.; GRAEF, G.L.; SHOEMAKER, R.C.; KEIM, P. RFLP mapping using near-isogenic lines in the soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Theor. Appl. Genet.** 81:189-198.

NIDEIRA SEMENTES **NA 5909 RR** Disponível em: <Erro! A referência de hiperlink não é válida.>. Acesso 08/01/2013.

REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 25. 2003: Uberaba, MG. **Resumos**. Uberaba: Embrapa, 2003. 324 p.

REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 27.2005: Cornélio Procópio, PR. **Resumos**. Cornélio Procópio: Embrapa, 2005. 583p.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2nd Ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, V. 3, 1989.

SCHUSTER, I.; ABDELNOOR, R.V.; MARIN, S.R.R.; CARVALHO, V.P.; KIIHL, R.A.S.; SILVA, J.F.V.; SEDIYAMA, C.S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of a new major QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, n.1, p.91-96, 2001.

SCHUSTER, I.; QUEIROZ, V.T.; TEIXEIRA, A.I.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Determinação da pureza varietal de sementes de soja com o auxílio de marcadores moleculares microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 39: 247-25, 2004.

SCHUSTER, I.; OLIVEIRA, M.A.R. Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas. In: Carpentieri-Pípolo V. (Ed) **Biotecnologia na agricultura: aplicações e biossegurança**. Cascavel: COODETEC. 392p. 2006.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. **Estatística Genômica: Aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. 2ª edição. Viçosa-MG, UFV. 568p. 2008.

SCHUMUTZ, J.; CANNON, S.B.; SCHULUETER, J.; MA, J.; MITROS, T.; NELSON, W.; HYTEN, D.L.; SONG, Q.; THELEN, J.J.; CHENG, J.; XU, D.; HELLSTEN, U.; MAY, G.D.; YU, Y.; SAKURA, T.; UMEZAWA, T.; BHATTACHARYA, M.K.; SANDHU, D.; VALLIYODAN, B.; LINDQUIST, E.; PETO, M.; GRANT, D.; SHU, S.; GOODSTEIN, D.; BARRY, K.; FUTRELL-GRIGGS, M.; ABERNATHY, B.; DU, J.; THIAN, Z.; ZHU, L.; GILL, N.; JOSHI, T.; LIBAULT, M.; SETHURAMAN, A.; ZANG, X.C.; SHINOZAKI, K.; NQUYEN, H.T.; WING, R.A.; CREGAN, P.; SPCHT, J.; GRIMWOOD, J.; ROKHSAR, D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R.C.; JACKSON, S.A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature** 463:178-183, 2010.

SNPC –Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2012. Disponível em : <<http://www.agricultura.gov.br/>> Acesso em: 10 dez. 2012.

SYNGENTA SEEDS **V-Max RR (NK 7059RR)** Disponível em: <[http://www.syngenta.com/country/br/pt/produtosemarcas/sementes/grandes-culturas/soja/Documents/sementes\\_soja.pdf](http://www.syngenta.com/country/br/pt/produtosemarcas/sementes/grandes-culturas/soja/Documents/sementes_soja.pdf)>. Acesso em: 07/01/2013.

TMG – Tropical Melhoramento e Genética **Anta 82** Disponível em: <<http://www.tmg.agr.br/cultivares/soja/anta82>>. Acesso em: 10/01/13.

## 5 ARTIGO 2

### CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS EM SOJA ASSOCIADOS AO TIPO DE CRESCIMENTO DAS PLANTAS

**Resumo:** O tipo de crescimento determinado da haste da soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é controlado pelo alelo recessivo (*dt1dt1*); já o indeterminado é controlado pelo alelo semidominante (*Dt1Dt1*), visto que, em populações segregantes, o genótipo heterozigoto (*Dt1dt1*) resulta em fenótipo semideterminado. Neste estudo, o objetivo foi avaliar características de três progênies de soja, cada uma com três linhas irmãs, contrastando para o gene *Dt1*. Os experimentos foram conduzidos na latitude 24°57'21"S. Nas progênies avaliadas, não houve diferenças entre os tipos de crescimento indeterminado e determinado na massa de planta, diâmetro da haste e massa total de grãos. Sob outra acepção, linhas com tipo de crescimento semideterminado apresentaram massa de planta, diâmetro da haste, número de vagens, número de ramos e massa total de grãos maiores que as linhas com tipo de crescimento indeterminado, e altura de plantas maior que linhas com tipo de crescimento determinado. Além dessas características, o comprimento do racemo da haste é maior nas plantas com tipo de crescimento determinado que em plantas com tipo de crescimento semideterminado. As três progênies avaliadas apresentam racemos apicais nos ramos nas plantas com tipo de crescimento determinado e as com tipos de crescimento semideterminado e indeterminado não apresentam racemos apicais nos ramos.

**Palavras-chave** *Glycine max*. Crescimento determinado. Crescimento semideterminado. Crescimento indeterminado. Racemo apical.

## AGRONOMIC IN SOYBEANS CHACTERISTICS ASSOCIATED TO PLANT GROWTH TYPE

**Abstract:** Determinate type of stem growth of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] is controlled by the recessive allele (*dt1dt1*) The indeterminate type is controlled by semi-dominant allele (*Dt1Dt1*) and in segregating populations the heterozygous genotype (*Dt1dt1*) results in semi-determinate phenotype. The objective of this study was to evaluate three characteristics of soybean progenies, each one with three sisters lines contrasting for gene *Dt1*. The experiments were conducted at latitude 24°57'21" S. Results indicated that there were no differences between of indeterminate and determinate growth type when the mass of the plant, stem diameter and total mass of grains were evaluated. However lines of semi-determinate growth type showed mass of plant, stem diameter, number of pods, number of branches and the total mass of grains larger than the lines of indeterminate growth. Shorter plants of soybeans were always characterized on the determinate genotypes. The length of the stem raceme was heigher in plants of determinate when compared to plants of semi-determinate growth type. All progenies exhibited branches with apical racemes on determinate and semi-determinate growth type of growth did not present apical racemes in the branches.

**Key Words** *Glycine max*. Determinate growth. Semi-determinate growth. Indeterminate growth. Apical raceme.

### 5.1 INTRODUÇÃO

O tipo de crescimento da haste da soja influencia várias características agrônômicas. As plantas, com tipo de crescimento determinado, geralmente atingem alturas menores com maior resistência ao acamamento, menores alturas da inserção da primeira vagem e mais ramos por planta do que cultivares de tipo de crescimento indeterminado de grupo de maturidade semelhante. Linhagens de tipo determinado também possuem menor período de floração do que linhagens de tipo indeterminado (BERNARD, 1972; KILGORE-NORQUEST & SNELLER, 2000).

Dois genes, *Dt1* e *Dt2*, afetam a terminação da haste em soja (BERNARD, 1972). Um alelo recessivo, *dt1*, e um alelo dominante, *Dt2*, apressam o término do crescimento apical da haste, o que diminui a altura da planta e número de nós. Desses, *dt1* tem um efeito maior. BERNARD (1972) observou um fenótipo, intermediário semideterminado, distinto dos fenótipos indeterminado e determinado. Essas plantas semideterminadas segregaram para tipos indeterminado e determinado, indicando que *Dt1* se comportou como um gene parcialmente dominante na base genética testada.

Outro alelo recessivo, *dt1-t*, também afeta o fenótipo da planta. Embora plantas com genótipo *dt1-tdt1-t* e *Dt2Dt2* apresentem fenótipo semelhantes para altura da planta, *dt1-tdt1-t*, é mais semelhante ao *dt1dt1* quando se considera folhas e traços estaminais no ápice da haste de plantas de soja (THOMPSON et al., 1997).

Plantas, com tipo de crescimento determinado, sempre foram muito distintas, no entanto, os testes de progênie, ocasionalmente, mostraram que plantas semideterminadas ou indeterminadas foram classificadas erroneamente (BERNARD, 1972).

BERNARD (1972) observou que plantas, com os dois genes *Dt1* e *Dt2* em homozigose, apresentam fenótipo similar ao tipo de crescimento semideterminado heterozigoto (*Dt1dt1*).

HEATHERLY & SMITH (2004), na latitude 33°26' N, observaram em sistema de produção de soja antecipada nas cultivares testadas, aumento de altura e número de nós entre o começo da floração (R1) e a terminação do crescimento da haste. Os aumentos foram maiores para as cultivares de grupo de maturidade relativa IV e tipo de crescimento indeterminado, quando comparado com cultivares de grupo de maturidade relativa V e tipo de crescimento determinado.

Cultivares de soja, com tipo de crescimento indeterminado, permite a semeadura antecipada. Já a antecipação da semeadura da soja não só favorece o melhor manejo de pragas e doenças como também possibilita, em algumas regiões do Brasil, o cultivo de milho (*Zea mays*), no mesmo ano agrícola. No controle da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*), segundo YORINORI et al. (2003), devem ser adotadas estratégias como semear preferencialmente cultivares precoces no início da época recomendada para cada região. O objetivo é escapar do período de maior risco de ocorrência da doença. BRACCINI et al. (2010) constataram que a antecipação da semeadura da safrinha é uma estratégia válida para obtenção de bom desempenho agrônômico e de maiores produtividades na semeadura da segunda safra de milho. A sucessão soja-milho em safrinha é uma alternativa viável para a região Oeste do Estado do Paraná, desde que a semeadura da soja seja realizada na primeira quinzena de outubro e a do milho safrinha na primeira quinzena de fevereiro. STULP et al. (2009) também constataram que a antecipação na semeadura da soja pode ser uma alternativa viável para a região Oeste do estado do Paraná.

No Brasil, no ano agrícola de 2010/2011 entre as dez cultivares de soja mais semeada, metade apresentou o tipo de crescimento indeterminado e a outra metade determinado, uma vez que, na região Sul do país, as cinco cultivares mais semeadas foram as cultivares de tipo de crescimento indeterminado (KLEFFMANN & PARTNER, 2011).

O objetivo desse estudo foi avaliar características agronômicas de três progênies de soja, cada uma formada por três linhas irmãs contrastantes para o gene *Dt1*, identificadas pelo fenótipo dos respectivos tipos de crescimento da haste da soja.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Estudos de campo no ano agrícola 2011/2012 foram conduzidos na Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola-COODETEC, no município de Cascavel, Paraná, Brasil, na latitude 24°57'21''S e altitude de 781 m. Foram avaliadas três progênies, cada uma composta por três linhas que contrastavam para o tipo de crescimento, totalizando nove linhas. Em todos os cruzamentos, foram utilizados como parental masculino a linhagem (A19459 x A19778) que possui o genótipo *Dt1Dt1* (fenótipo com tipo de crescimento indeterminado) e, como parental feminino, as linhagens OC 95-3006, OC 95-3312 e OC 92-128 que possuem o genótipo *dt1dt1* (fenótipo com tipo de crescimento determinado).

As progênies avaliadas foram CD 10-71690 com a genealogia OC 95-3006 x (A19459 x A19778), CD 10-71822 com a genealogia OC 95-3312 x (A19459 x A19778) e CD 10-71463 com a genealogia OC 92-128 x (A19459 x A19778). As três progênies pertencem ao grupo de maturação relativa VI. As progênies foram desenvolvidas por meio do método genealógico modificado até a geração F<sub>4</sub>. Nesta geração, foram selecionadas plantas com tipo de crescimento semideterminado, ou seja, heterozigotas para o gene *Dt1*. Na geração F<sub>4:5</sub>, foram conduzidas as famílias sem seleção para tipo de crescimento. Na geração F<sub>4:6</sub>, foram selecionadas plantas com tipo de crescimento semideterminado, após 6 gerações é esperado um nível de homozigose de 98,4375%. As linhas irmãs tiveram mais três gerações para produção de sementes, visto que, na geração F<sub>4:6:9</sub>, em que se esperam 12,5% de plantas heterozigotas (*Dt1dt1*), ou seja, tipo de crescimento semideterminado; 43,75% de plantas com tipo de crescimento determinado (*dt1dt1*)

e 43,75% de plantas com tipo de crescimento indeterminado (*D1Dt1*). Neste nível de segregação, foram instalados os experimentos, semeados em 07 de dezembro de 2011 e as plantas colhidas em 09 de abril de 2012.

Para a análise, foram conduzidos três experimentos, cada um com uma progênie segregando para tipo de crescimento. As parcelas tinham 10 linhas de 5 metros, com espaçamento de 0,45 metros e 15 plantas por metro linear. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com sete repetições e três tratamentos. Estes se delinearão para retiradas de plantas pelo fenótipo com tipos de crescimento determinado, semideterminado e indeterminado. Para cada tipo de crescimento, retiraram oito plantas por parcela. As plantas com tipo de crescimento determinado, foram selecionadas pela menor altura e presença de racemo apical na haste. Para a seleção de plantas com tipo de crescimento semideterminado, ou seja, plantas altas e com presença de racemo apical na haste. As plantas, com tipo de crescimento indeterminado, foram selecionadas plantas altas e com ausência de racemo apical na haste.

A massa de planta foi obtida de plantas com seu sistema radicular residual, antes da trilha para obtenção de grãos. Para identificar a altura das plantas, mediu-se da base até o ápice da haste, cujo diâmetro foi obtido na altura do primeiro nó e, para precisar o número, procedeu-se a contagem de todos os nós da haste. O número de vagens foi obtido pela contagem de todas as vagens de cada planta. O número de grãos por vagem foi obtido pela divisão do número total de grãos de cada planta pelo número de vagens da planta. Totalizou-se a massa de grãos após a homogeneização de umidade para 13%. A massa de 1000 grãos foi obtida pela massa de 100 grãos e multiplicado por 10. O número de nós férteis ocorreu pela contagem dos nós que tinham pelo menos uma vagem. O comprimento do racemo da haste foi obtido medindo com paquímetro eletrônico a distância da base do racemo até seu ápice. O número de vagens no racemo foi obtido pela contagem de todas as vagens presentes no racemo. O número de ramos foi obtido pela contagem de todos os ramos da planta. A identificação de racemo apical em ramos foi obtida pela observação em todos os ápices dos ramos da planta. O grau de acamamento das plantas foi avaliado, no momento da colheita das plantas, utilizando-se da escala de 0 a 100, em que 0 significa planta ereta, ou seja, resistente ao acamamento e 100 significa planta totalmente inclinada ou altamente suscetível ao acamamento.

Caracterizações e quantificações foram feitas em plantas individuais e, posteriormente, deu-se a média das oito plantas de cada repetição.

Foram feitas análises estatísticas de variância em blocos ao acaso e teste Tukey a 5% de probabilidade para o comparativo de médias. Procederam-se as análises estatísticas com os dados originais, exceto para a característica número de ramos, para a qual foi aplicada a transformação de dados para  $\sqrt{x+0,5}$ .

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da quantificação das características massa total, altura, diâmetro da haste, número de nós na haste principal, número de vagens, número de grãos por vagem, massa de 1000 grãos e massa total de grãos de plantas das progênes CD 10-71690, CD 10-71822 e CD 10-71463, e suas respectivas linhas irmãs expressando os tipos de crescimento determinado, semideterminado e indeterminado, apresentados na tabela 1. Pode-se observar que a massa total de plantas de soja foi maior nas plantas com tipo de crescimento semideterminado. As plantas com os tipos de crescimento determinado (*dt1dt1*) e indeterminado (*Dt1Dt1*) apresentaram massa total semelhante entre as progênes avaliadas. Pelos resultados obtidos nas três progênes avaliadas, observa-se que as plantas de tipo de crescimento semideterminado (*Dt1dt1*) foram mais eficientes na produção de massa total.

A altura de planta foi menor nas plantas com tipo de crescimento determinado. BERNARD (1972), KILGORE-NORQUEST & SNELLER (2000) e LIU et al. (2010) obtiveram resultados semelhantes. Plantas, com tipo de crescimento indeterminado, apresentaram maiores altura nas progênes CD 10-71690 e CD 10-71822. Na progênie CD 10-71463, a maior altura de planta foi obtida nas plantas com tipo de crescimento semideterminado. BERNARD (1972) identificou linhas isogênicas para os locus *Dt1* e *Dt2*, visto que a altura de planta para o tipo de crescimento semideterminado foi intermediária entre plantas de tipo de crescimento determinado e indeterminado. LIU et al. (2010) também obteve altura intermediária em plantas heterozigotas (*Dt1dt1*), quando comparado com homozigotas *dt1dt1* e *Dt1Dt1*. A progênie CD 10-71463, com tipo de crescimento semideterminado, foi uma exceção em relação à altura de plantas, pois superou a altura de plantas com

tipo de crescimento indeterminado, indicando que o background genético também influencia na altura da planta de soja.

O diâmetro da haste de plantas, com tipo de crescimento semideterminado, foi maior do que as plantas com tipo de crescimento indeterminado nas três progênes e em duas progênes em relação ao tipo de crescimento determinado. Na progênie CD 10-71690, o diâmetro da haste de plantas com tipo de crescimento semideterminado foi semelhante às plantas com tipo de crescimento determinado. Segundo MIYASAKA et al. (1981), diâmetro da haste de plantas de soja correlaciona-se positivamente com o rendimento de grãos.

As plantas, com tipo de crescimento determinado, apresentaram menor número de nós na haste principal, acarretando uma redução na altura de planta das progênes. Resultados semelhantes foram obtidos por HEATHERLY & SMITH (2004) e BERNARD (1972). As plantas, de tipo de crescimento semideterminado, apresentaram maior número de nós na haste principal que as plantas com tipo de crescimento indeterminado, exceto na progênie CD 10-71822 que foi semelhante.

O número de vagens foi menor nas plantas com tipo de crescimento indeterminado. Para as plantas, com tipo de crescimento determinado, somente a progênie CD 10-71463 apresentou menor número de vagens que as plantas de tipo de crescimento semideterminado.

Nas progênes CD 10-71822 e CD 10-71463, o número de grãos por vagem foi maior nas plantas com tipo de crescimento indeterminado e semideterminado, e, na progênie CD 10-71690, não houve diferenças no número de grãos por vagem.

A massa de 1000 grãos foi menor nas plantas com tipo de crescimento determinado e maior nas plantas com tipo de crescimento indeterminado. Na progênie CD 10-71822, a massa de 1000 grãos não diferiu entre plantas com tipo de crescimento semideterminado e indeterminado. Nas progênes CD 10-71690 e CD 10-71463 e suas respectivas linhas irmãs de tipo de crescimento semideterminado, a massa de 1000 grãos ficou intermediária entre os tipos determinado e indeterminado. A massa de 1000 grãos, maior nas plantas com tipo indeterminado, foi inversa ao menor número de vagens, nesse tipo de crescimento.

A massa total de grãos obtida evidenciou que não houve diferença entre os tipos de crescimento determinado e indeterminado nas três progênes

avaliadas. Plantas com tipo de crescimento semideterminado apresentaram maior massa total de grãos nas três progênes, exceto na progênie CD 10-71690, que não diferiu do tipo de crescimento determinado.

**Tabela 6** Média da quantificação de características de planta de soja (massa de planta, altura de planta, diâmetro da haste, número de nós na haste principal, número de vagens, número de grãos por vagem, massa de 1000 grãos e massa total de grãos) das progênes CD 10-71690, CD 10-71822 e CD 10-71463, expressando os tipos de crescimento determinado, semideterminado e indeterminado.

CD 10-71822	<i>dt1dt1</i>	Determinado	38,7	77,3	7,3	16,9	72,1	1,9 b	131,2	17,9
	<i>Dt1dt1</i>	Semideterminado	b	c	b	c	a	2,3 a	b	b
	<i>Dt1Dt1</i>	Indeterminado	55,1	114,6	8,3	22,2	78,6	2,2 a	139,9	24,9
			a	b	a	a	a		a	a
			43,3	128,0	7,4	22,7	58,0		144,2	18,6
			b	a	b	a	b		a	b
DMS-Tukey (5%)			7,43	5,86		0,70	9,32	0,14	8,20	2,91
					0,67					
CD 10-71463	<i>dt1dt1</i>		30,1	59,4	7,2	14,8	54,2 b	2,2 b	126,9	
	<i>Dt1dt1</i>		b	c	b	c	66,0 a	2,4 a	c	15,0
	<i>Dt1Dt1</i>		47,6	105,3	8,1	21,4	43,2 c	2,5 a	151,4	b
			a	a	a	a			b	
		Determinado	34,4	96,9	7,4	20,2			161,6	24,2
		Semideterminado								
		Indeterminado	b	b	b	b			a	a
										17,4
										b
DMS-Tukey (5%)			6,71	5,49	0,58	0,75	10,07	0,13	5,99	3,91

Progênie	Tipo de crescimento		Massa de planta (g)	Altura de planta (cm)	Diâmetro da haste (mm)	Número de nós na haste principal	Número de vagens	Número de grãos por vagem	Massa de 1000 grãos (g)	Massa total de grãos (g)
	Genótipo	Fenótipo								
CD 10-71690	<i>dt1dt1</i>	Determinado	77,6 b	80,2 c	9,7	16,7 c	142,1	1,8 a	148,1 c	37,3
	<i>Dt1dt1</i>	Semideterminado	96,7 a	124,9 b	ab	24,6 a	a	1,9 a	161,2	ab
	<i>Dt1Dt1</i>	Indeterminado	65,2 b	128,1 a	10,5 a	23,1 b	141,8	2,0 a	b	44,0 a
					9,0 b		a		168,1	28,4 b
						83,3		a		
						b				
DMS-Tukey (5%)			22,74	2,55	1,05	0,99	37,94	0,34	5,95	10,06

Na tabela 7, pode-se observar grau de acamamento, número de nós férteis, comprimento do racemo da haste, número de vagens no racemo da haste e número de ramos das progênes CD 10-71690, CD 10-71822 e CD 10-71463. O grau de acamamento foi muito baixo e não houve diferença entre as linhas irmãs

para os tipos de crescimento. WILCOX & SEDIYAMA (1981) compararam linhas com tipos de crescimento determinado e indeterminado, na geração  $F_9$  de um mesmo cruzamento, visto que as plantas com tipo de crescimento indeterminado foram muito suscetíveis ao acamamento. A característica acamamento de plantas de soja é conferida por vários genes, sendo influenciada pelo ambiente (VERNETTI, 1981). As cinco cultivares mais semeadas na safra 2010/2011, na região sul do Brasil, são com tipo de crescimento indeterminado e apresentam a característica de resistência ao acamamento (KLEFFMANN & PARTNER, 2011). O acamamento, além de ser influenciado pelo ambiente e background genético, pode ser influenciado pelo tipo de crescimento. Neste estudo, como o acamamento de plantas foi muito baixo, não interferiu nas outras características avaliadas.

O número de nós férteis foi menor nas plantas com tipo de crescimento determinado. Plantas, com tipo de crescimento semideterminado, apresentaram maior número de nós férteis nas progênies CD 10-71690 e CD 10-71463. Na progênie CD 10-71822, o número de nós férteis foi semelhante nos tipos de crescimento semideterminado e indeterminado.

O comprimento do racemo da haste foi maior nas plantas com tipo de crescimento determinado do que em plantas com tipo de crescimento semideterminado. Plantas, com tipo de crescimento indeterminado, não apresentaram racemo na haste. Por esse motivo, torna-se um bom diferenciador de tipo de crescimento.

Os números de vagens, no racemo da haste, foram similares nas progênies CD 10-71690 e CD 10-71822. Na progênie CD 10-71463, plantas, com tipo de crescimento determinado, apresentaram maior número de vagens no racemo. Plantas, com tipo de crescimento indeterminado, não apresentaram racemo terminal na haste.

Dessa análise, considera-se o número de ramos maior nas plantas com tipo de crescimento determinado. As plantas, com tipo de crescimento indeterminado, apresentaram menor número de ramos. O número de ramos das plantas, com tipo de crescimento semideterminado, foi intermediário aos tipos de crescimento determinado e indeterminado.

**Tabela 7** Média da quantificação de características de planta de soja (grau de acamamento, número de nós férteis, comprimento do racemo da haste, número de vagens no racemo da haste e número de ramos) das progênie CD 10-71690, CD 10-71822 e CD 10-71463, expressando os tipos de crescimento determinado, semideterminado e indeterminado.

Progênie	Tipo de crescimento		Grau de acamamento *	Número de nós férteis	Comprimento do racemo da haste (mm)	Número de vagens no racemo da haste	Número de ramos
	Genótipo	Fenótipo					
CD 10-71690	<i>dt1</i>	Determinado	4,8 a	14,0 c	40,8 a	3,5 a	6,9 a
	<i>dt1</i>	ado	6,3 a	21,0 a	22,6 b	3,4 a	5,1 b
	<i>Dt1</i>	Semidet	5,6 a	18,9 b	0 c	0	4,3 c
	<i>dt1</i>	erminad				b	
	<i>Dt1</i>	o					
	<i>Dt1</i>	Indeterm					
DMS-Tukey (5%)			4,21	1,37	6,20	0,74	0,64
CD 10-71822	<i>dt1dt1</i>	Determinado	5,9 a	14,9	25,0	5,3 a	2,0 a
	<i>Dt1dt1</i>	Semideterminado	6,6 a	b	a	5,4 a	1,3 b
	<i>Dt1Dt1</i>	Indeterminado	6,4 a	19,7	22,1	0 b	0,7 c
	DMS-Tukey (5%)			3,94	0,79	2,89	1,08
CD 10-71463	<i>dt1dt1</i>		5,5 a	10,0	55,5	6,8 a	2,3 a
	<i>Dt1dt1</i>		6,1 a	c	a	5,2 b	0,9 b
	<i>Dt1Dt1</i>	Determinado	6,9 a		39,9	0 c	0,3 c
		Semideterminado		16,4	b		
		Indeterminado		a	0		
DMS-Tukey (5%)			3,39	1,05	8,84	1,31	0,18

\*Escala de 0 a 100, onde 0 significa planta ereta, ou seja, resistente ao acamamento e 100 significa planta totalmente inclinada ou altamente suscetível ao acamamento.

Na tabela 8, pode-se observar que as três progênie apresentaram racemos apicais nos ramos das plantas, com tipo de crescimento determinado. As plantas, com tipos de crescimento semideterminado e indeterminado, não apresentaram racemos terminais nos ramos.

**Tabela 8** Identificação de racemo apical em ramos, em plantas de soja com tipos de crescimento determinado, semideterminado e indeterminado.

Progênie	Tipo de crescimento		Racemo apical em ramos
	Genótipo	Fenótipo	
CD 10-71690	<i>dt1dt1</i>	Determinado	Presença
	<i>Dt1dt1</i>	Semideterminado	Ausência
	<i>Dt1Dt1</i>	Indeterminado	Ausência
CD 10-71822	<i>dt1dt1</i>	Determinado	Presença
	<i>Dt1dt1</i>	Semideterminado	Ausência
	<i>Dt1Dt1</i>	Indeterminado	Ausência
CD 10-71463	<i>dt1dt1</i>	Determinado	Presença
	<i>Dt1dt1</i>	Semideterminado	Ausência
	<i>Dt1Dt1</i>	Indeterminado	Ausência

As três progênie testadas evidenciaram que as suas linhas irmãs, para os tipos de crescimento indeterminado e determinado, não diferiram na massa total de planta, diâmetro do caule e massa total de grãos, o que não evidenciou mérito maior para um desses tipos de crescimento. As plantas, com tipo de crescimento indeterminado, apresentaram maior número de nós na haste principal e maior altura — fatores que possibilitam a semeadura antecipada. Estas características contribuíram para que agricultores do Sul do Brasil preferissem cultivares de tipo de crescimento indeterminado em detrimento das cultivares de tipo de crescimento determinado (KLEFFMANN & PARTNER, 2011).

Baseado nas condições em que foram obtidos os resultados nas três progênie e suas linhas irmãs avaliadas, as plantas de tipo de crescimento semideterminado apresentaram massa total de planta, diâmetro da haste, número de vagens, número de ramos e massa total de grãos maiores que as plantas com tipo de crescimento indeterminado; e a altura das plantas maior que as plantas com tipo de crescimento determinado. BERNARD (1972) observou resultados semelhantes em plantas com tipo de crescimento semideterminado, contendo os dois genes *Dt1* e *Dt2* em homozigose. Plantas homozigotas, para os genes *Dt1* e *Dt2*, apresentam fenótipo similar ao tipo de crescimento semideterminado heterozigoto (*Dt1dt1*). A superioridade do tipo de crescimento semideterminado, em algumas características avaliadas em relação aos outros tipos de crescimento, deve-se provavelmente à morfologia das plantas. Estes resultados permitem depreender que plantas, com tipo de crescimento semideterminado contendo os genes *Dt1* e *Dt2* em homozigose, podem proporcionar ganhos de rendimentos e podem adaptar-se a

semeaduras antecipadas, quando comparado com linhas irmãs de tipo de crescimento indeterminado e determinado.

#### 5.4 CONCLUSÕES

Plantas, com tipo de crescimento semideterminado, apresentam massa de planta, diâmetro da haste, número de vagens, número de ramos e massa total de grãos maiores que as plantas de tipo de crescimento indeterminado e também a altura de plantas foi maior do que as plantas com tipo de crescimento determinado.

O comprimento do racemo da haste é maior nas plantas com tipo de crescimento determinado do que em plantas com tipo de crescimento semideterminado.

As três progênies avaliadas apresentam racemos apicais nos ramos das plantas com tipo de crescimento determinado, e as de tipos de crescimento semideterminado e indeterminado não apresentam racemos terminais nos ramos.

#### 5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERNARD, R.L. Two genes affecting stem termination in soybean. **Crop Sci** 12: 235-239, 1972.

BRACCINI, A.L.; STÜP, M.; ALBRECHT, L.P.; ÁVILA, M.R; SCAPIM, C.A.; RICCI, T.T. Desempenho agrônomo e produtividade na sucessão soja-milho safrinha. **Acta Scientiarum: Agronomy** 32(4) 651, 2010.

HEATHERLY, L.G.; SMITH, J.R. Effect of soybean stem growth habit on height and node number after beginning bloom in the midsouthern USA **Crop Sci** 44: 1855-1858, 2004.

KLEFFMANN & PARTNER Comércio e Assessoria Mercadológica e Representação. **Amis seed soybean 2010/2011**, 2011. <<http://www.kleffmann.com.br>>

KILGORE-NORQUEST, L.; SNELLER, C.H. Effect of stem termination on soybean traits in southern U.S production systems. **Crop Sci** 40: 83-90, 2000.

LIU, B.; WATANABE, S.; UCHIYAMA, T.; KONG, F.; KANAZAWA, A.; XIA, Z.; NAGAMATSU, A.; ARAI, M.; YAMADA, T.; KITAMURA, K.; MASUTA, C.; HARADA, K.; ABE, J. The soybean stem growth habit gene *Dt1* is an ortholog of *Arabidopsis TERMINAL FLOWER1*. **Plant Physiol** 153: 198-210, 2010.

MIYASAKA, S.; VERNETTI, F.J.; SEDIYAMA, T.; MEDINA, J.C. Resultados de pesquisas em outros países. In: Miyasaka S e Medina JC (Ed.) **A soja no Brasil**. 1981. p. 261-278.

STÜP, M.; BRACCINI, A.L.; ALBRECHT, L.P.; ÁVILA, M.R.; SCAPIM, C.A.; SCHUSTER, I. Desempenho agrônômico de três cultivares de soja em diferentes épocas em duas safras. **Ciência e Agrotecnologia** 33 1240-1248, 2009.

THOMPSON, J.A.; BERNARD, R.L. A third allele at the soybean *dt1* locus. **Crop Sci** 37: 757-762, 1997.

VERNETTI, F.J. Herança de caracteres qualitativos e quantitativos. In: Miyazaki S e Medina JC (Ed.) **A soja no Brasil**. 226-240, 1981.

WILCOX, J.R.; SEDIYAMA, T. Interrelationships among height, lodging and yield in determinate and indeterminate soybeans. **Euphytica** 30 323-326, 1981.

YORINORI, J.T.; WILFRIDO, M.P.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F. Ferrugem da soja: identificação e controle. **Embrapa** 204: 15, 2003.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As conclusões — obtidas neste trabalho — permitem a utilização de marcadores moleculares na seleção de plantas e linhagens de soja, viabilizando a caracterização com maior assertividade no tipo de crescimento da haste da soja. Também evidencia o potencial de ganho de rendimento com plantas de tipo de crescimento semideterminado. O tipo de crescimento é a característica que contribui na adaptação e estabilidade de cultivares de soja, assumindo elevada importância quando ocorrem mudanças de épocas preferencias de semeadura. A demanda pelos agricultores tem sido de semeadura de culturas como o milho na sequência da cultura da soja e também pela maior necessidade de precocidade para o escape do ataque de pragas e doenças, mas com cultivares altamente eficientes em produtividade de grãos. Estudos comparativos dos três tipos de crescimento, utilizando-se de linhagens isogênicas, podem levar à demonstração de ganhos genéticos, principalmente com o tipo de crescimento semideterminado, pois este tipo ainda é pouco explorado nos programas de melhoramento.