

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

LÍVIA MARIA NOGUEIRA

**Elaboração de um banco de dados de microssatélites para a  
identificação molecular de cultivares de soja**

MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
MARÇO – 2012

LÍVIA MARIA NOGUEIRA

**Elaboração de um banco de dados de microssatélites para a  
identificação molecular de cultivares de soja**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro de Lucca e Braccini.

MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
MARÇO – 2012

Dedico aos meus pais, Salviano José Nogueira e Sônia Regina Nogueira, ao meu irmão, Anselmo Nogueira, e ao meu marido, Salvador Lima Brito Junior, que me incentivaram e apoiaram nessa importante etapa da minha vida.

Aos meus amigos que nunca me deixaram desanimar e estiveram sempre presentes.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a finalização de mais uma etapa; se consegui mais essa vitória foi porque ele me abençoou e me deu forças para seguir adiante.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja), UEM e Capes, pelo apoio financeiro, concessão de bolsa e disponibilização de estrutura física para a realização deste trabalho.

Ao professor doutor Alessandro de Lucca e Braccini, pelos ensinamentos, apoio e toda ajuda necessária.

Ao doutor Ricardo Vilela Abdelnoor, pela ajuda no andamento do trabalho, pela disponibilidade e pelo imenso incentivo.

À doutora Francismar Correa Marcelino-Guimarães, pelo apoio técnico-científico e incentivo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Planta, agradeço-lhes pelas discussões, conselhos e incentivo.

Aos estagiários que fazem parte do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, Águida, Allan, Amanda, André, Adriana, Carolina, Cibelle, Cynara, Idenize, Elton, Euziane, Fabiola, Gislaine, João Vitor, Ju, Juliane, Juliana Marcolino, Larissa, Lizandra, Luana, Maria Cecília, Michelle, Mayra, Maysa, Nori, Noelle Giacomini, Renata Fuganti, Tati e Valéria, pelo convívio e pelo aprendizado adquirido nesses anos.

Aos técnicos do Laboratório, Silvana Marin, César Silveira, Nilson Vieira, Vera Pieronte, Danielle Gregógio, Márcia Kuwahara e Renan Milagres, pela imensa ajuda que cada um de vocês disponibilizou para a realização deste trabalho.

Às amigas Kelly, Rafaela, Renata, Michele, Márcia e Adriana, obrigada pelo apoio, pela presença extremamente importante em todos os momentos difíceis enfrentados ao longo do caminho.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Vegetal, Francisco José da Cruz e Maria Valquíria Magro, muito obrigada pelo auxílio e pela compreensão quando necessários.

Aos amigos do programa de Pós-Graduação por tudo o que passamos nesses dois anos de luta.

Ao meu marido, Salvador Lima Brito Junior, pela imensa ajuda nas discussões sobre o trabalho, pelas inúmeras ideias, revisões, pela imensa compreensão e carinho, que me ajudaram na minha recuperação, pois sem sua companhia e seu cuidado a realização dessa dissertação teria sido muito mais difícil.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

## **BIOGRAFIA**

Lívia Maria Nogueira, filha de Sônia Regina Nogueira e Salviano José Nogueira, nasceu em 22 de junho de 1983, na cidade de Assis, estado de São Paulo. É casada com Salvador Lima Brito Júnior.

De 1993 a 1996, cursou da quinta à sétima série do Ensino Fundamental, no Colégio Adventista do Sétimo Dia, em Assis, estado de São Paulo.

Em 1997, cursou a oitava série do Ensino Fundamental, na Escola Estadual E.E.P.G.Dr. Clybas Pinto Ferraz, em Assis, São Paulo.

De 1998 a 2001, cursou do primeiro ao terceiro ano do Ensino Médio no colégio “Anglo Xereta”, em Assis, São Paulo.

Em julho de 2007, diplomou-se em Ciências Biológicas - Licenciatura Plena e Bacharelado, pela Universidade Estadual do Norte do Paraná, em Bandeirantes, Paraná.

Em março de 2010, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), em nível de Mestrado, da Universidade Estadual de Maringá, estado do Paraná.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>12</b>
2.1. Soja no Brasil .....	12
2.2. Caracterização e proteção de cultivares .....	13
2.3. Marcadores microssatélites .....	15
2.4. Métodos de detecção .....	17
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
3.1. Material genético e avaliação fenotípica .....	20
3.2. Extração de DNA .....	21
3.3. Seleção dos marcadores microssatélites .....	22
3.4. Reação de polimerase em cadeia (PCR) e eletroforese em géis de poliacrilamida .....	24
3.5. Montagem do sistema de análise de fragmentos .....	25
3.6. Interpretação genética .....	25
3.7. Estimativa da Informatividade dos marcadores microssatélites .....	26
3.8. Seleção de marcadores para identificação das cultivares .....	26
3.9. Certificação das cultivares .....	26
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>46</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>

## RESUMO

NOGUEIRA, Livia Maria, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, março de 2012. **Elaboração de um banco de dados de microssatélites para a identificação molecular de cultivares de soja.** Professor Orientador: Alessandro de Lucca e Braccini. Professor Conselheiro: Ricardo Vilela Abdelnoor.

A estreita base genética da soja dificulta a caracterização das cultivares com base em marcadores morfológicos, principalmente para registro e proteção no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. Os marcadores moleculares têm se tornado uma ferramenta importante nos casos de indistinguibilidade de cultivares, pois não são influenciados pelo ambiente e podem ser utilizados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. Dentre os marcadores moleculares, os microssatélites estão distribuídos ao longo de todo genoma, são específicos, multialélicos e codominantes. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar um conjunto de 48 cultivares de soja, utilizando marcadores microssatélites detectados em sequenciador automático; estimar as frequências alélicas de um conjunto de 24 marcadores microssatélites e trabalhar com um número mínimo de marcadores para a caracterização inequívoca. As análises dos fragmentos foram geradas em sequenciador automático ABI PRISM Genetic Analyser® 3130xl e o software Genotyper® foi aplicado para a visualização exata dos alelos e para emissão de dados automaticamente. Os eletroferogramas obtidos permitiram a identificação dos marcadores mais informativos e de seus respectivos alelos. No total foram observados 173 alelos, com uma média de 7,17 alelos por marcadores. Os marcadores mais polimórficos foram Sat\_105 e GMABAB. Os marcadores Satt216, Satt586, Satt233, Satt181 e Satt070 foram capazes de identificar e diferenciar todas as 48 cultivares. Com base nesses marcadores foi possível a elaboração das etiquetas genéticas e a criação de um banco de dados precioso. Tal sistema poderá ser utilizado para a caracterização de novas cultivares, auxiliando na proteção destas, bem como nos casos de análise de pureza genética de sementes em que a análise visual for duvidosa.

**Palavras-chave:** *Glycine max*, proteção de cultivares, marcadores moleculares.

## ABSTRACT

NOGUEIRA, Livia Maria, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, March, 2012. **Development of microsatellites database for soybean cultivar identification.** Adviser: Alessandro de Lucca e Braccini. Committee member: Ricardo Vilela Abdelnoor.

The narrow genetic base of soybean has made cultivars characterization based on morphological markers very difficult, mainly for register and protection at the National Service for Plant Variety Protection. Molecular markers have become an important tool as complementary information in cases of indistinguishable cultivars, once they are not environmental sensitive and can be applied at any stage of plant development. Among molecular markers, microsatellites are distributed through all plant genome, specific, multiallelic and co-dominant. This study had as objectives to characterize a group of 48 soybean cultivars using microsatellites molecular markers detected in automated sequencer; to estimate the allelic frequencies of 24 SSR and to estimate the minimum number of markers for unequivocal characterization. The analyses of amplified fragments were carried out in the automatic sequencer ABI PRISM Genetic Analyser<sup>®</sup> 3130xl and the GeneMapper<sup>®</sup> software was applied to precisely identify the alleles in an automatic fashion. The electropherograms allowed the identification of informative loci and its alleles. A total of 173 alleles were observed, with an average of 7.17 alleles per loci. The most informative markers were Sat\_105 and GMABAB. The SSR markers Satt216, Satt586, Satt233, Satt181 and Satt070 were able to identify all 48 cultivars. Based on these loci it was possible to elaborate genetic tags and also to create a valuable microsatellites database. This system can be used in the characterization of new cultivars, assisting the protection procedure, as well as in cases of seed genetic purity when visual evaluations are doubtful.

**Key words:** *Glycine max*, protection of cultivars, molecular markers.

## 1. INTRODUÇÃO

A soja *Glycine max* (L.) Merrill é uma planta leguminosa de reprodução autógama originária do norte da China (Burton, 1997). O Brasil se destaca como o segundo maior produtor mundial da cultura, sendo esta considerada uma das mais importantes para o agronegócio brasileiro (Agrianual, 2012). Semeada ao longo de todo o território nacional, devido principalmente ao grande número de genótipos adaptados às diferentes condições climáticas do país e ao desenvolvimento de cultivares melhoradas, a soja pode ser explorada em regiões antes consideradas inaptas para o seu cultivo econômico (Abdelnoor et al., 1995; Alcântara Neto, 2001; Priolli et al., 2002).

Com a crescente demanda por plantas adaptadas, resistentes a determinadas doenças, mais produtivas e tolerantes a estresses bióticos e abióticos, entre outras características, as empresas de pesquisa públicas e privadas têm buscado obter genótipos que atendam a essas necessidades. Assim, o número de cultivares de soja disponíveis no mercado tem aumentado significativamente (Schuster et al., 2006). Desta forma, o processo de registro e proteção de cultivares é de suma importância, pois regulamenta a produção e comercialização de sementes no país, sendo um importante processo para assegurar a identidade genética e a qualidade varietal, dando sustentabilidade parcial ou total à continuidade de programas de melhoramento e o subsequente lançamento de novas cultivares de interesse para o agronegócio brasileiro.

Com a promulgação da Lei de Proteção de Cultivares (nº 9.456), sancionada em 25 de abril de 1997 e regularizada pelo Decreto nº 2.366 em 05 de novembro de 2007, uma maior precisão na identificação de cultivares tornou-se necessária. A soja é a cultura que apresenta o maior número de pedidos de proteção e o maior número de cultivares protegidas no Brasil (Snpc 2010). Em geral, as cultivares, para serem protegidas, requerem a utilização de descritores morfológicos, avaliados em ensaios de Distinguíbilidade, Homogeneidade e Estabilidade (DHE) (Rodrigues et al., 2008).

Nas espécies com base genética estreita, como no caso da soja, variedades obtidas por hibridização dentro de grupos elites de parentais, que são geneticamente similares, tendem a ser muito semelhantes e, muitas vezes, indistinguíveis pelas características morfológicas, tornando-se cada vez mais difícil a discriminação das

cultivares utilizando apenas essas características (Lanza et al., 2000). Assim, a caracterização molecular garante resultados mais precisos na identificação genética dessas variedades, além de permitir maior distinguibilidade das mesmas (Garcia et al., 2007).

Um sistema baseado em marcadores de DNA é capaz de identificar um padrão único de combinação de marcadores moleculares para cada variedade, sendo extremamente essenciais para facilitar a proteção de novas variedades, além de poder garantir o direito de propriedade (Rodrigues et al., 2008). Muitos trabalhos foram realizados com o uso de marcadores microssatélites SSR (*Single Sequence Repeats*) na caracterização de cultivares de várias espécies de plantas como trigo, cevada e milho (Lima et al., 2003). Esses marcadores têm demonstrado ser uma excelente ferramenta para a avaliação da distância genética entre indivíduos, para a identificação de cultivares e para análises de pedigree (Priolli et al., 2002).

A detecção dos alelos dos marcadores moleculares microssatélites em sequenciador automático permite estimar, com elevada precisão, os tamanhos desses fragmentos, possibilitando a geração de um banco de dados que possa ser utilizado na caracterização das cultivares e na proteção da propriedade intelectual. Para uma caracterização inequívoca das cultivares, é necessário identificar um conjunto de marcadores informativos e conhecer as frequências dos alelos presentes nos marcadores microssatélites (Schuster et al., 2009). Essas frequências alélicas, após identificadas em um conjunto de marcadores microssatélites, se estabelecem um número mínimo de marcadores para sua caracterização evidente. Desta forma, a caracterização molecular automatizada de cultivares de soja, torna-se uma importante ferramenta na proteção do patrimônio genético da espécie.

O presente trabalho teve como objetivo criar um banco de dados de cultivares de soja caracterizado com um grupo de marcadores microssatélites, e complementar com informações geradas no trabalho desenvolvido por Passianotto (2010). Este trabalho também teve como objetivo identificar os diferentes alelos e estimar as frequências alélicas dos marcadores microssatélites e identificar um conjunto mínimo de marcadores capazes de diferenciar as cultivares utilizadas nesse estudo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Soja no Brasil

O primeiro relato de soja no Brasil foi datado em 1882 no Estado da Bahia, por Gustavo D'utra, o qual realizou estudos de avaliação de cultivares introduzidas no país, sendo a referência mais antiga encontrada na literatura (Medina, 1981). Posteriormente, a cultura foi introduzida no Estado de São Paulo, em 1908, pelos imigrantes japoneses, apresentando os primeiros resultados de colheita da cultura. Introduzida pelo professor E.C.Craig da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em 1914, no Rio Grande do Sul (Bonetti, 1981), a área cultivada e a produtividade foi aumentando gradativamente, iniciando uma produção em escala comercial. Entre o período de 1961 a 1965, o Rio Grande do Sul foi responsável por 90% da produção brasileira de soja, como consta nas estatísticas do Estado (Costa, 1996).

Do Rio Grande do Sul, a soja expandiu-se para o restante do país, inicialmente para o Estado de Santa Catarina e depois para o Paraná, São Paulo, Minas Gerais e região Centro-Oeste. Atualmente, a soja é cultivada praticamente em todo o território nacional, sendo o principal produto agrícola do país (Schlesinger, 2006).

Ainda na década de 60, experimentos com a cultura foram conduzidos pelo Ministério da Agricultura a fim de averiguar o comportamento dos genótipos de soja, propiciando o desenvolvimento de variedades geneticamente melhoradas (Bonetti, 1981). O Estado Brasileiro aportou recursos para infraestrutura e pesquisa e, em 1973, foi criada a Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Dois anos depois, foram inauguradas as unidades da Embrapa Soja e da Embrapa Cerrado que contribuíram para o desenvolvimento de sementes adaptadas ao clima tropical, viabilizando a extensão da produção nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste (Schlesinger, 2006).

Em 1976, no estado do Paraná junto com o Rio Grande do Sul colaboraram, em partes iguais, com o total da soja produzida no país (Costa, 1996) contribuindo assim para o crescimento da cultura da soja no Brasil. Os diversos programas de melhoramento genético foram de grande importância na produção de variedades melhoradas contendo um alto rendimento e adaptadas às nossas condições

climáticas, fazendo com que o país ocupasse a vice-liderança mundial na produção e exportação dessa leguminosa (Bonetti, 1981).

A sojicultura brasileira sofreu oscilações ao longo dos anos. Em 1989 chegou a alcançar 24 milhões de toneladas, valor superior à média anual do período de 1990 a 1996 com cerca de 21,5 milhões de toneladas. A produção tornou-se mais estável, tendo um crescimento gradativo, aliada à continuidade das restrições ao financiamento da produção e a uma relativa estagnação da demanda mundial da soja, na qual a produção e o consumo tiveram um novo impulso no Brasil e no mundo (Hasse, 1996).

A soja é uma das principais *commodities* agrícolas em todo o mundo e o Brasil é o segundo maior produtor com 75 milhões de toneladas produzidos em 24,2 milhões de hectares em 2011 (Conab, 2011). A cultura possibilitou mudanças na agricultura brasileira, fortalecendo e diversificando a agroindústria, sustentando a ampliação da suinocultura e a avicultura, motivando assim a modernização da infraestrutura de transporte e modificando hábitos alimentares (Hasse, 1996).

Segundo dados fornecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, os maiores estados produtores de soja são: Mato Grosso com uma produção de 20,4 milhões de toneladas, Paraná com uma produção de 15,4 milhões de toneladas, Rio Grande do Sul com 8,5 e Goiás com 7,8 milhões de toneladas, segundo avaliações feitas no período de 2010/2011 (Mapa, 2011) e de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) a safra nacional de grãos do período 2011/2012 é estimada em 157 milhões de toneladas.

## **2.2. Caracterização e proteção de cultivares**

Programas de melhoramento genético de qualquer espécie realizam investimentos em pesquisa, com o lançamento de novas cultivares e comercialização de sementes. É por meio dessa comercialização que estes investimentos são recuperados, quando novas cultivares chegam ao mercado. A fim de garantir e proteger a propriedade intelectual sobre as cultivares, foi criado um sistema de proteção de cultivares. Vários países estão utilizando esse recurso e em geral, essa atividade é feita por meio de marcadores morfológicos, avaliados em ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE).

Para que uma cultivar possa ser registrada e protegida no Brasil, é necessário que o material seja avaliado e alcance esses critérios (DHE), sendo os mesmos utilizados internacionalmente (Bayle, 1983).

Direitos de propriedade intelectual (DPI) são direitos conferidos exclusivamente ao desenvolvimento de variedades registradas, que são atribuídos pelo Estado em relação às invenções comercialmente úteis, e protegidos por leis de patentes. Como consequência os obtentores conseguem a garantia de proteção de suas inovações (Blakeney, 2011).

Já a proteção das variedades vegetais (PVP) foi criada para ajudar as empresas a proteger suas cultivares da exploração comercial, de forma não autorizada, por terceiros. Embora não tenham a mesma exclusividade de uma patente, oferecem ao proprietário uma proteção legal de cultivares para a venda exclusiva de uma cultivar protegida. Mas isso só é possível caso seja demonstrado que essa variedade é distinta de todas as outras dentro dessa espécie (Diwan e Cregan, 1997).

Assim, países em desenvolvimento precisam estabelecer um sistema de proteção de variedades apropriado, fazendo com que esse processo seja parte de uma estratégia ampla para o desenvolvimento de um sistema capaz de proteger cultivares contidos num banco ativo de germoplasma, pois o programa de proteção das variedades proporciona um controle da utilização de novas variedades e controla uma apropriação indébita (Tripp et al., 2007), assegurando dessa forma um contínuo progresso do agronegócio.

A soja é uma cultura de base genética estreita, apesar do grande número de cultivares existentes no Brasil. A baixa variabilidade genética é resultante principalmente do fato das cultivares atualmente serem originárias de poucos ancestrais (Alcântara Neto, 2005; Borém e Miranda, 2009), dificultando a separação entre as cultivares (Vieira et al., 2009).

Os descritores morfológicos representam um “cartão de visita” dessas novas variedades e têm papel fundamental na divulgação das características agronômicas de novos materiais genéticos, recomendados para análise de pureza de sementes (Vieira et al., 2009). Em soja, as principais características associadas às sementes para descrever uma cultivar são: cor do hilo, tamanho, aspectos do tegumento e coloração (Moreira et al., 1999) além de características padrões como cor de flor,

pubescência, forma de folha, hábito de crescimento, maturidade e outros traços morfológicos, contribuindo para registro e proteção das variedades (Diwan e Cregan, 1997).

Descritores proteicos e enzimáticos também possuem papel importante na identificação de cultivares, obtendo estimativas de distância genética entre genótipos, e assim, acesso à variabilidade existente (Smith e Smith, 1992). Dez anos após o surgimento dos primeiros trabalhos sobre descritores de proteínas e enzimas, surgiram os de DNA, que representam um avanço para o melhoramento de plantas, com capacidade de detectar variações genéticas diretamente de sequências de DNA e acessar o genótipo de um indivíduo, eliminando influências do ambiente (Alcântara Neto, 2001; Caixeta et al., 2009) e podendo ser utilizados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (Passianotto, 2010).

A caracterização com marcadores moleculares, quando feita sistematicamente, permite a obtenção de um banco de dados precioso que poderão ser utilizados para inúmeros objetivos, como a verificação de genealogias (Lee et al., 1995), acesso à variabilidade existente no programa, níveis de diversidade genética em diferentes culturas (Cao et al., 1997), auxílio no planejamento de cruzamentos, especialmente em genótipos elites e aparentados (Lee, 1995) e proteção de cultivares (Milach, 1998). O conhecimento do padrão molecular de cultivares possibilita realizar testes de pureza genética em lotes de sementes (Penner et al., 1998).

Visando garantir a discriminação precisa e identificação genética dessas variedades a caracterização com marcadores moleculares vem se apresentando como um potencial descritor complementar, além de permitir maior distinguibilidade das mesmas (Garcia et al., 2007; Schuster et al., 2009).

### **2.3. Marcadores microssatélites**

Os marcadores moleculares de microssatélites (SSR) consistem em sequências de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem. As sequências microssatélites são normalmente conservadas entre indivíduos de uma mesma espécie, o que permite selecionar *primers* específicos que amplificam, via PCR (*Polimerase Chain Reaction*), fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Apresentam, quase que invariavelmente, extensivo polimorfismo para

tamanhos dos fragmentos amplificados resultantes da ocorrência de diferentes números de unidades repetitivas. Elas podem ser originadas através de *crossing-over*, erro da DNA polimerase durante a replicação ou eventos de inserções/deleções, substituições, bem como mudanças no elemento repetitivo (Borém e Caixeta, 2009).

As regiões contendo as sequências únicas repetidas são amplificadas individualmente em reação de polimerase em cadeia (PCR), se utilizando de *primers* específicos de 20 a 30 bases complementares às sequências únicas que flanqueiam os microssatélites. A presença de diferentes números de elementos repetitivos constitui um marcador genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo *locus*. A sequência (AT)<sub>n</sub> em plantas é a mais abundante, sendo que em soja as sequências (classes) mais frequentes de SSR são (AT)<sub>n</sub> e (ATT)<sub>n</sub> (Caixeta et al., 2009).

São marcadores de caráter codominante e multialélicos, específicos e distribuídos ao longo de todo o genoma, o que os torna bastante precisos e facilmente reprodutíveis (Alcântara Neto, 2001; Caixeta et al., 2009; Wang et al., 2011). Destacam-se como importante tecnologia e são essenciais para reconhecer diferenças entre características quantitativas (Leal et al., 2010) e qualitativas (Rabel et al., 2010).

Estudos já demonstraram a utilização desses marcadores na caracterização de cultivares de várias espécies de plantas como trigo, cevada, milho e soja (Cregan et al., 1999; Lima et al., 2003; Lightfoot et al., 2003) e para testes de pureza genética de sementes de soja na formação de grupos de sementes chamados de “*bulk*” (Rabel, 2010). A análise em “*bulks*” fornece resultados com maior rapidez, reduzindo tempo e custo. Marcadores microssatélites permitem identificar se existe variação genética entre as sementes que constituem o mesmo “*bulk*” (Rabel et al., 2010).

Seu alto nível de diversidade alélica possibilita a obtenção de polimorfismos em populações multiparentais, populações derivadas de híbridos de genótipos relacionados e estudos genéticos de espécies autógamas de estreita base genética, como a soja (Morgante e Olivieri, 1993) tornando-os capazes de distinguir acessos de germoplasma diretamente relacionados. São apontados como os mais informativos, capazes de integrar informações de variações fenotípicas e genotípicas

e ideais para o mapeamento genético (Hyten et al., 2007, 2009; Silva et al., 2008) e caracterização de cultivares (Borém e Caixeta, 2009).

São utilizados também, em estudos de ligação, identificação de genótipos, conservação de germoplasma, estudos de diversidade genética (Vieira et al., 2009) análise gênica e de marcadores quantitativos (QTLs) (Bernacchi et al., 1998), análise de pedigree, seleção assistida (Lemos et al., 2011), análise de bibliotecas para clonagem de genes (Grant et al., 2010), proteção de variedades e avaliação de pureza de sementes (Schuster et al., 2004). O alto nível de variação detectado aumenta a resolução do estudo de genealogia e diversidade genética do germoplasma e reduz o número de marcadores requeridos para caracterizar os genótipos (Bernacchi et al., 1998; Blair et al., 2009).

Com o rápido avanço das técnicas, o uso de marcadores de DNA vem se tornando rotineiros nos programas de melhoramento genético. A técnica de análise de microssatélites utilizada para determinar pureza genética e produção de sementes visa garantir a qualidade genética das sementes (Rabel et al., 2010) com sucesso para a geração de estimativas consistentes de individualidade genética de plantas, animais e seres humanos (Alcântara Neto, 2005), potencial para detectar diferenças entre indivíduos, consistência e replicação de resultados (Schlotterer, 2004; Schulman, 2007; Bernardo, 2008), bem como a avaliação da distância genética entre indivíduos, para a identificação de cultivares e análises de pedigree (Priolli et. al., 2002).

#### **2.4. Métodos de detecção**

A análise de DNA por eletroforese em gel é uma técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas em um determinado gel durante a aplicação de uma diferença de potencial e esses fragmentos são separados com base em seu tamanho. Essa matriz de gel consiste em longas cadeias de polímeros e a dimensão das cadeias ou poros depende da concentração utilizada ao preparar o gel. A eletroforese normalmente é utilizada para separar proteínas e moléculas de DNA e RNA. Vários métodos têm sido utilizados para estimar o peso molecular de moléculas de DNA. Para moléculas de 1-2 kb pares de bases de nucleótideos, o método de electroforese em gel de poliacrilamida fornece o mais elevado grau de

resolução e é, em princípio, o mais simples. Já os géis de agarose são utilizados para separar fragmentos grandes de DNA de 500-20kb (Maniatis et al., 1975).

A visualização das sequências SSR pode ser feita por meio de gel de eletroforese de agarose de alta resolução e gel de poliacrilamida desnaturante (Caixeta et al., 2009; Ferreira e Grattapaglia, 1998). Tem-se usado, também, *primers* fluorescentes em sequenciador automático de DNA visualizados em *softwares* computacionais específicos (Diwan e Cregan, 1997; Narvel et al., 2000).

A detecção dos alelos dos marcadores moleculares em sequenciador automático permite identificar os genótipos de soja cultivados no país, estimando com elevada precisão os tamanhos dos alelos presentes em cada cultivar (Passianotto, 2010), possibilitando, assim, a geração de um banco de dados que possa ser utilizado na caracterização das cultivares e na proteção da propriedade intelectual. Para uma caracterização inequívoca das cultivares, é necessário identificar um conjunto de marcadores informativos e conhecer as frequências dos alelos presentes nestes marcadores (Schuster et al., 2009).

No sequenciador automático os fragmentos são identificados fluorescências acopladas a cada *primer* ou em nucleotídeos terminadores de cadeia didesoxinucleotídica. Diferentes corantes são utilizados para cada uma das quatro reações ou para cada base de nucleotídeos (A, C, G e T) e múltiplas amostras são analisadas em diferentes linhas do mesmo gel. Na superfície do gel de sequenciamento, ou capilar, um laser excita os corantes fluorescentes no momento em que os fragmentos passam pelos detectores, que coletam as intensidades da emissão de quatro diferentes comprimentos de onda. Esse processo continua até ser construída uma imagem do gel na escala desejada das bandas com quatro diferentes colorações, onde cada banda corresponde aos fragmentos de tamanho específico (Ewing et al., 1998; Kaiser et al., 1989).

Além da possibilidade de automação e da utilização de *multiplex* (amostras diferentes em uma mesma reação), a detecção dos marcadores microssatélites em géis capilares do sequenciador automático permitem distinguir com facilidade alelos que variam em uma única unidade repetitiva, assegurando uma maior precisão à análise genética onde uma ampla variabilidade alélica é esperada. O ajuste de um sistema de amplificação *multiplex* deve ser bastante criterioso, para possibilitar o desenvolvimento de um sistema que gere padrões de produtos amplificados

claramente distinguíveis entre os marcadores em indivíduos, que tenha um padrão de amplificação consistente e que não seja variável quando realizados procedimentos com pequenas modificações, como as encontradas entre diferentes laboratórios (Brondani, 2006).

Dentre as vantagens apresentadas na utilização do sequenciador automatizado, destacam-se a possibilidade de analisar simultaneamente um maior número de marcadores microssatélites, a redução do tempo necessário para genotipar um grande número de indivíduos, a obtenção de dados mais precisos, resultantes da adição de um marcador de massa molecular interno para cada amostra genotipada e uma maior agilidade no processamento dos dados gerados, assim como a transferência direta destes dados para determinação de parâmetros genéticos por softwares específicos (Brondani, 2006).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material genético e avaliação fenotípica

Quarenta e oito cultivares de soja pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Soja da Embrapa Soja (Quadro 1) foram analisadas. Para cada cultivar foram utilizadas dezesseis plantas distribuídas em dois vasos, contendo oito plantas, provenientes de semeadura realizada em solo preparado com areia e substrato, totalizando noventa e seis vasos. O experimento foi conduzido em casa de vegetação climatizada com controle de temperatura e umidade relativa do ar. Um trifólio foi coletado em estágio V<sub>3</sub> da planta, armazenado em caixa de isopor contendo nitrogênio líquido e em seguida transferido a um freezer -80°C para posterior extração do DNA. Avaliações fenotípicas como: cor da flor, cor do hilo, cor de pubescência e cor do hipocótilo foram realizadas nas dezesseis plantas separadamente, correspondentes a cada cultivar, para eliminar a chance de uma mistura de sementes oriundas do banco ativo de germoplasma. As cultivares foram mantidas em casa de vegetação até estágio de senescência para colheita das vagens e sementes.

Quadro 1- Representação das 48 cultivares de soja analisadas pertencentes ao BAG

Amostra	Cultivar	Amostra	Cultivar	Amostra	Cultivar
1	BRSMG 760 SRR	17	BRS Silvania RR	33	BRSMG 752s
2	BRSGO 8360	18	BRS Tordilha RR	34	BRS 245RR
3	BRSGO Mineiros RR	19	BRS Estancia RR	35	BRSMG 811C
4	BRSGO Princesa	20	BRS Cambona	36	BRSGO 7560
5	BRSGO Luziânia RR	21	BRS Fepagro 24	37	BRSMG 750 SRR
6	BRSGO Ipameri	22	BRS 244RR	38	BRS Sinuelo
7	BRS Raissa	23	BRS 8460RR	39	BRS 137
8	BRSGO Paraíso	24	BRSMG 790 A	40	BRS Pala
9	BRS Taura RR	25	BRSMG 800A	41	BRS 205
10	BRS Valiosa RR	26	BRS 153	42	BRS 154
11	BRSMG 740 SRR	27	BRS 7860 RR	43	BRS 266 [Querência]
12	BRS Amaralina	28	BRS 316RR	44	BRS 211
13	BRSGO 7960	29	MG/BR46 (Conquista)	45	BRSGO 8660
14	BRSGO 7561RR	30	BRSMG68 [Vencedora]	46	BRS Tebana
15	BRS 138	31	BRS Tertúlia RR	47	BRSGO 8060
16	BRS 8560RR	32	BRS Pampa RR	48	BRS 8160 RR

### 3.2. Extração de DNA

Das dezesseis plantas de cada cultivar, oito foram correspondentes às amostras prova e a outra metade do grupo correspondentes às contra-prova, processadas independentemente e agrupadas em *bulks*. O DNA de cada *bulk* foi extraído segundo Keim et al. (1988). A amostra *bulk* foi macerada em presença de nitrogênio líquido em almofariz. Posteriormente, foi transferido cerca de 1 g da amostra macerada para um tubo de 2,0 mL, sendo adicionado 1 mL de tampão de extração [Tris-HCl 100 mM pH 8,0; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA; 1% (m/v) de brometo de trimetil N-cetil amônio (CTAB); 0,1% (v/v) de 2-mercaptoetanol e água]. A suspensão foi feita em banho maria em 65° C por sessenta minutos, com agitação manual a cada quinze minutos.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 6.000 rpm por 10 minutos, com transferência da fase aquosa para outro tubo, tomando cuidado para não pegar o *pellet*. Foi adicionado igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), o qual foi misturado à solução por inversões e posteriormente centrifugado a 6.000 rpm por 15 minutos. Estes últimos passos foram repetidos duas vezes. O DNA foi precipitado com a adição de isopropanol (2/3 do volume) e, inversões foram feitas até que DNA torna-se visível, e em seguida mantidos por duas horas a uma temperatura de -20°C.

Posteriormente, a solução foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e adicionando-se 500 µL de etanol 70% para a limpeza do DNA. Uma nova centrifugação foi realizada por 5 minutos e o sobrenadante descartado, tomando o devido cuidado de manter o *pellet* no tubo. Procedeu-se a secagem do *pellet* mantendo o tubo invertido em temperatura ambiente por 2 horas e retirando o excesso ao redor do tubo com papel. Em seguida, o DNA foi precipitado em 400 µl de TE pH 8,0 (Tris/1mM EDTA) a uma concentração final de 10 mM. Ao final do processo foi adicionado a enzima RNase A, para degradação do RNA e a uma concentração final de 40 µL mL<sup>-1</sup> e incubado a 37°C por, pelo menos, 30 minutos.

As análises espectrofotométricas para determinar a concentração das amostras de DNA foram feitas utilizando o equipamento *Nanodrop N-1000 Spectrophotometer*, mantendo a concentração final de 10 ng µL<sup>-1</sup>. A integridade das amostras foi verificada em gel de agarose 1%.

### 3.3. Seleção dos marcadores microssatélites

A seleção dos 24 marcadores microssatélites (Quadro 2) foi feita com base em trabalho realizado anteriormente por Passianotto (2010), com exceção dos Satt216, Satt038 e Sat\_105 que foram acrescentados a lista. Todos foram selecionados considerando seu conteúdo informativo para discriminação genética individual, melhor robustez e repetibilidade nos procedimentos de análise e interpretação de dados detectados em diferentes germoplasma (Song et al., 1999; Song et al., 2004; Wu et al., 2008; Passianotto, 2010).

Quadro 2- Representação dos 24 marcadores microssatélites selecionados para compor o sistema de genotipagem de cultivares de soja, seus respectivos cromossomos, sequências senso e anti-senso e fluorescências utilizadas para marcação

<i>Locus</i>	<i>C<sup>y</sup></i>	Sequência (5'-3')	Motif <sup>2</sup>	Natureza	Alelo da Williams 82 <sup>4</sup>	Fluorescência <sup>5/</sup>	Referência
Sat_038	10	F – GCGTCGCAACTTTTTTCATTTTTCTTACT R – GCGAGTTCCTTTTAACAACACTCACTTTT	(AT) 20	Di	117	FAM	Song et al. (2004)
Sat_064	18	F – TAGCTTTATAATGAGTGTGATAGAT R – GTATGCAAGGGATTAATTAAG	(AT) 34	Di	146	HEX	Song et al. (2004)
Sat_085	4	F – GGTTTTAGATCCTTAAATTTGT R – GGGGAAGCAAGTAGCT	(AT) 23	Di	206	FAM	Song et al. (2004)
Sat_105	20	F – TTCCATACAAGATATCAAGTGAATTG R – GCTCCCCTACATTGGTAGTAAA	(AT) 30	Di	269	FAM	Song et al. (2004)
Satt002	17	F – TGTGGGTAAAATAGATAAAAAT R – TCATTTTGAATCGTTGAA	(ATT) 25	Tri	127	NED	Song et al. (2004)
Satt005	2	F – TATCCTAGAGAAGAAGACTAAAAA R – GTCGATTAGGCTTGAATA	(ATT) 19	Tri	141	FAM	Song et al. (2004)
Satt038	18	F – GGGAATCTTTTTTCTTTCTATTAAGTT R – GGGCATTGAAATGGTTTTAGTCA	(ATT) 17	Tri	176	FAM	Cregan et al. 1999
Satt042	5	F – GACTTAATTGCTTGCTATGA R – GTGGTGCACACTCACTT	(ATT) 27	Tri	172	HEX	Cregan et al. (1999)
Satt045	15	F – TGGTTTCTACTTTCTATAATTATTT R – ATGCCTCTCCCTCCT	(ATT) 18	Tri	140	HEX	Song et al. (2004)
Satt046	9	F – AAAATAACTAAAATGTCTTCTCA R – TTGGTCAGATTATTATAAGATTG	(ATT) 20	Tri	222	FAM	Wu et al. (2008)

Quadro 2, Continuação...

Locus	C <sup>1/</sup>	Seqüência (5'-3')	Motif <sup>2</sup>	Natureza	Alelo da Williams 82 <sup>4</sup>	Fluorescência <sup>5/</sup>	Referência
Satt070	14	F – TAAAAATTTAAAATACTAGAAGACAAC R – TGGCATTAGAAAATGATATG	(ATT) 24	Tri	177	NED	Song et al. (2004)
Satt079	6	F – AGTCGAAGATACACAATTAGAT R – CTTTTAGACACAAATTTATCACT	(ATT) 13	Tri	148	FAM	Cregan et al. (1999)
Satt100	6	F – ACCTCATTGTCATATAA R – TTGGAACAAGTAATAATAACA	(ATT) 33	Tri	168	NED	Song et al. (2004)
Satt114	13	F – GGGTTATCCTCCCAATA R – ATATGGGATGATAAGGTGAAA	(ATT) 17	Tri	109	NED	Song et al. (2004)
Satt181	12	F – TGGCTAGCAGATTGACA R – GGAGCATAGCTGTTAGGA	(ATT) 18	Tri	214	NED	Song et al. (2004)
Satt233	8	F – AAGCATACTCGTCGTAAC R – GCGGTGCAAAGATATTAGAAA	(ATT) 16	Tri	200	NED	Cregan et al. (1999)
Satt216	2	F- GCGAACTCTACGGGTCAGTAGTTAT R- GCGTAAGATGGCCTAGAAAGAGGATG	(ATT) 22	Tri	174	NED	Cregan et al. 1999
Satt431	16	F – GCGTGGCACCCCTTGATAAATAA R – GCGCACGAAAGTTTTCTGTAACA	(ATT) 21	Tri	250	HEX	Song et al. (2004)
Satt540	7	F – CTGGCGAATCAAGCTTTGTAAC R – CCGTGATTGCGAAGAGGATATT	(ATT) 12	Tri	152	NED	Song et al. (2004)
Satt586	13	F – GCGGCCTCCAACTCCAAGTAT R – GCGCCCAAATGATTAATCACTCA	(ATT) 19	Tri	212	HEX	Wu et al. (2008)
Satt612	18	F – GTCATACTGGGTGTTTCATTTATGAC R – GCGCCTTTTAGTCTCTGAAAGTATTT	(ATT) 10	Tri	241	HEX	Song et al. (2004)
Sct_001	16	F – TTAAGTTTCCCTCTCTCTCT R – CTTGTTCCCTCGCTCAC	(CT)1 3	Di	0	FAM	Song et al. (2004)
Sct_187	16	F – CATGCTCCCATTCTCT R – AACATTGGCTTTTTACTTAG	(CT)1 0	Di	0	HEX	Song et al. (2004)
GMABAB	3	F – CAAAACATAAAAAAGGTGAGA R – AAGAACCACACTAATATTATT	(ATT)25	Tri	162	HEX	Song et al. (2004)

<sup>1/</sup> Número do cromossomo: Fonte: Soybase (<http://soybase.LG2Xsome.php>).

<sup>2</sup> Motif = número de repetições de nucleotídeos.

Trinucleotídeo ou Dinucleotídeo.

<sup>4</sup> Alelo presente na cultivar Williams 82:

Fonte: <http://bfgl.anri.barc.usda.gov/cgi-bin/soybean/MarkerSNP=Marker>.

<sup>5</sup> FAM = Fluorescência azul; HEX = Fluorescência verde; NED = Fluorescência amarela.

### 3.4. Reação de polimerase em cadeia (PCR) e eletroforese em géis de poliacrilamida

Os marcadores microssatélites selecionados foram utilizados para amplificar as cultivares a serem analisadas, mediante reação de polimerase em cadeia (PCR). As amplificações foram realizadas em termocicladores *Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)* programados para 30 ciclos de 94°C por 5 minutos, seguido de 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Ao final dos 30 ciclos, foi adicionada uma etapa de 72°C por 30 minutos. As reações de PCR foram realizadas em placas com volume total da reação de 20 µL. A reação foi constituída de 10 ng de DNA, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão PCR 1X (2 mM de Tris e 5 mM de KCl), 0,2 mM de dNTP, 0,4 µM de cada *primer* (senso e antisenso), proteína estabilizadora BSA 10X, uma unidade de *Platinum Taq DNA Polimerase* e água.

As reações de PCR foram realizadas e cada cultivar foi testada com os 24 SSR, o que permitiu distribuir as amostras nas colunas e os marcadores microssatélites em linhas, sendo possível utilizando 12 amostras, testa-las com 9 SSR totalizando uma placa de PCR com 96 poços. Para que as 48 cultivares fosse analisadas com os 24 marcadores microssatélites, foi necessário um total de 12 placas. Posteriormente, visando à montagem das placas para o sistema de genotipagem, na qual permitisse uma análise conjunta de marcadores no sequenciador, foi elaborada uma reação *multiplex* composta por três marcadores SSR em cada amostra.

Essa reação dispunha de *primers* contendo diferentes fluorescências, denominadas FAM, NED e HEX que foram agrupadas em um único poço. Após sua injeção nos capilares, sua diferenciação foi possível através da leitura das diferentes fluorescências presentes na amostras. Com a utilização do sequenciador automático foi possível visualizar e analisar várias amostras juntas, mesmo apresentando o mesmo tamanho, o importante nesse caso era que obrigatoriamente possuíssem fluorescências diferentes. Essa vantagem aumentou a eficiência e a rapidez da análise.

O tamanho dos fragmentos amplificados pelos marcadores foi estimado em gel de poliacrilamida 10%, delimitando uma margem de amplificação. Posteriormente, esses dados foram utilizados para as análises em sequenciador automático.

### 3.5. Montagem do sistema de análise de fragmentos

A análise eletroforética em sequenciador automático foi realizada em conjunto, o que permitiu uma análise contendo três marcadores microssatélites com diferentes fluorescências (FAM, HEX e NED), em uma única amostra. Utilizou-se a combinação de 5 µL de cada produto de amplificação para os três SSR totalizando 15 µL. Desse *mix* foi transferido 1,5 µL a uma nova placa e adicionado um *mix* composto por 9,0 µL de formamida (HI-DI) e 1,0 µL de um padrão interno de tamanho de fragmento *Rox* (*Gene Scan™ 500 ROX™ Size Standard - Applied Biosystems*).

Em seguida, as amostras foram desnaturadas a 95°C por cinco minutos em termocicladores e resfriadas em gelo. Posteriormente, as amostras foram analisadas no sequenciador automático *ABI PRISM Genetic Analyser® 3130xl* (*Applied Biosystem, Foster City, CA*) de acordo com recomendações do fabricante e analisados no sistema de genotipagem automatizado para caracterizar cultivares de soja do BAG.

Os fragmentos amplificados foram separados em eletroforese capilar e analisados em *software* específico do programa *GeneMapper® Software Version 4.0* (*Applied Biosystem*), sendo possível a identificando de cada marcador e seus respectivos alelos.

### 3.6. Interpretação genética

Para cada marcador utilizado foi identificado o número de alelos e anotado o genótipo correspondente. Foram determinados os tamanhos dos alelos, visualizados em picos emitidos pela eletroforese capilar e identificados em pares de base em comparação com o padrão interno de fragmentos de *DNA* (*ROX™ Size Standard*) e feito uma aproximação nos valores obtidos, com precisão de uma casa decimal. Para dinucleotídeos, a diferença mínima entre os tamanhos dos alelos foi de dois nucleotídeos, enquanto que para trinucleotídeos esta diferença foi de três nucleotídeos.

Um banco de dados foi construído, em que cada variedade foi caracterizada pelo alelo que possuía, sendo utilizado uma certificação que incluía letras que representavam cada marcador e suas respectivos alelos subscritos com base em leituras geradas através do sequenciador automático.

### 3.7. Estimativa da informatividade dos marcadores microssatélites

A informatividade genética de cada *locus* microssatélite foi avaliada por meio da frequência dos alelos, utilizando a expressão da informação de conteúdo de polimorfismo, denominado de (*Polymorphism Information Content* - PIC).

$$PIC = 1 - \sum_{j=1}^n p_{ij}^2$$

Onde  $p_{ij}$  representava a frequência do  $j$ -ésimo alelo para o  $i$ -ésimo *primer* (Anderson et al., 1993). Esta é uma estimativa da diversidade genética de cada marcador, e é um indicador do poder de discriminação genética de cada marcador em um teste de identidade (Weir, 1990). Os dados genotípicos são uma estimativa do número de alelos e das frequências dos alelos observados neste conjunto de amostras.

Essas análises permitem identificar entre os marcadores testados aqueles geneticamente mais informativos para testes de identidade genética. O valor de PIC é de fundamental importância para determinar o nível de polimorfismo dentro de uma população, ou seja, quanto maior o valor de PIC maior será a informação polimórfica obtida.

### 3.8. Seleção de marcadores para identificação das cultivares

Com base nas diferenças dos tamanhos de fragmentos amplificados por cada marcador no conjunto das 48 cultivares, foi identificado o grupo mínimo de marcadores capaz de diferenciar uma específica cultivar dentre todas analisadas neste presente estudo.

### 3.9. Certificação das cultivares

Para cada um dos marcadores microssatélites, foram atribuídas letras com o correspondente tamanho do alelo subscrito ao lado, gerando dessa forma uma etiqueta genética capaz de distinguir determinada cultivar, que podem ser utilizadas em caso de indistinguibilidade de descritores morfológicos, nos processos de registro e proteção de cultivares, bem como em casos de proteção da propriedade intelectual.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os genótipos de soja selecionados foram caracterizados fenotipicamente, em casa de vegetação, para quatro características diferenciadoras: cor de hipocótilo, cor de flor, cor da pubescência e cor do hilo (Quadro 3). Essas avaliações foram comparadas ao sistema de identificação de cultivares presentes no BAG, para verificar se houve ou não mistura de sementes. Nenhuma diferença foi observada entre eles, evidenciando que não houve mistura ou contaminação do material.

Os 23 marcadores microssatélites previamente estabelecidos por Passianotto (2010), por apresentarem alto polimorfismo e abranger 17 dos 20 cromossomos presentes no genoma da soja, foram representados neste estudo (Quadro 2). Baseado nesses resultados, as 48 cultivares foram testadas com 21 desse grupo de marcadores e adicionados mais três para a caracterização molecular.

O perfil genético dos genótipos estudados foi determinado com base no tamanho dos fragmentos gerados pelos 24 marcadores microssatélites no sequenciador. Os alelos foram identificados como picos nos eletroferogramas, constituindo um banco de dados de referência para comparação com novas cultivares e para controle e certificação genética de origem de lotes de sementes. Alelos com uma base de diferença foram anexados e tabulados como sendo um único alelo, sendo aproximados com base na natureza dos marcadores microssatélites (quando encontrado *locus* dinucleotídeo ou trinucleotídeo) (Quadro 4) e de acordo com tamanho padrão do alelo presente na cultivar Williams 82 (Quadro 2).

A soja, sendo uma espécie autógama, seria esperado que a maioria dos alelos encontrados fosse homozigoto e que cada cultivar apresentasse apenas um alelo em cada *locus*, visto que a maioria dessas cultivares se originaram de uma geração avançada de autopolinização. Entretanto, foi observado que algumas cultivares presentes nesse estudo apresentaram dois alelos para alguns marcadores, o que nesse caso, evidencia uma heterogeneidade residual, ou mistura de linhas puras.

Quadro 3- Características fenotípicas obtidas mediante análise das 48 cultivares de soja com base em avaliações realizadas pelo banco ativo de germoplasma

Amostra	Cultivar	Cor do pócótilo	Cor da flor	Cor da pubescência	Cor do hilo
1	BRS MG 760 SRR	Roxa	Roxa	Marrom escuro	Preto
2	BRS GO 8360	Roxa	Roxa	Cinza claro	Marrom claro
3	BRS GO Mineiros RR	Roxa	Roxa	Marrom claro	Marrom
4	BRS GO Princesa	Roxa	Roxa	Marrom claro	Preto
5	BRS GO Luziânia RR	Roxa	Roxa	Marrom escuro	Marrom
6	BRS GO Ipameri	Roxa	Roxa	Marrom claro	Preto
7	BRS Raíssa	Verde	Branca	Cinza claro	Marrom claro
8	BRS GO Paraíso	Roxa	Roxa	Marrom claro	Preto
9	BRS Taura RR	Verde	Branca	Marrom escuro	Preto
10	BRS Valiosa RR	Roxa	Roxa	Marrom claro	Preto
11	BRS MG 740 SRR	Roxa	Roxa	Cinza escuro	Preto
12	BRS Amaralina	Verde	Branca	Marrom escuro	Preto
13	BRS GO 7960	Roxa	Roxa	Cinza claro	Marrom claro
14	BRS GO 7561RR	Verde	Branca	Marrom escuro	Preto
15	BRS 138	Verde	Branca	Marrom escuro	Marrom
16	BRS 8560RR	Roxa	Roxa	Cinza escuro	Preto
17	BRS Sylvania RR	Verde	Branca	Cinza claro	Marrom
18	BRS Tordilha RR	Verde	Branca	Cinza claro	Marrom
19	BRS Estância RR	Verde	Branca	Marrom escuro	Marrom
20	BRS Cambona	Verde	Branca	Marrom escuro	Preto
21	BRS Fepagro 24	Verde	Branca	Marrom claro	Marrom
22	BRS 244 RR	Roxa	Roxa	Marrom claro	Marrom claro
23	BRS 8460RR	Verde	Branca	Marrom claro	Marrom
24	BRS MG 790 A	Roxa	Roxa	Cinza claro	Amarelo
25	BRS MG 800 A	Roxa	Roxa	Marrom escuro	Marrom
26	BRS 153	Verde	Branca	Cinza escuro	Marrom claro
27	BRS 7860RR	Verde	Branca	Marrom escuro	Marrom
28	BRS 316RR	Verde	Branca	Marrom claro	Preto
29	MG/BR46 (Conquista)	Roxa	Roxa	Marrom claro	Preto
30	BRSMG68 [Vencedora]	Roxa	Roxa	Marrom claro	Preto
31	BRS Tertúlia RR	Verde	Branca	Cinza claro	Marrom
32	BRS Pampa RR	Verde	Branca	Marrom escuro	Marrom
33	BRSMG 752s	Roxa	Roxa	Marrom escuro	Preto
34	BRS 245 RR	Verde	Branca	Cinza claro	Preto
35	BRS MG 811 C	Roxa	Roxa	Marrom claro	Preto
36	BRS GO 7560	Roxa	Roxa	Marrom claro	Preto
37	BRSMG 750SRR	Verde	Branca	Marrom escuro	Marrom
38	BRS Sinuelo	Verde	Branca	Cinza escuro	Marrom
39	BRS 137	Verde	Branca	Marrom escuro	Preto
40	BRS Pala	Verde	Branca	Cinza claro	Preto
41	BRS 205	Verde	Branca	Marrom escuro	Preto
42	BRS 154	Verde	Branca	Marrom claro	Preto
43	BRS 266 [Querência]	Verde	Branca	Marrom claro	Preto
44	BRS 211	Verde	Branca	Marrom claro	Marrom
45	BRS GO 8660	Verde	Branca	Cinza claro	Amarelo
46	BRS Tebana	Verde	Branca	Cinza claro	Marrom claro
47	BRSGO 8060	Verde	Branca	Marrom claro	Marrom
48	BRS 8160 RR	Roxa	Roxa	Cinza escuro	Preto

Quadro 4- Análise dos 24 marcadores microsatélites nas 48 cultivares de soja, e seus respectivos padrões alélicos representados em pares de base, detectados no sequenciador automático

Amostra	Cultivar	Sat_038	Sct_187	Satt181	Sat_085	Satt045	Satt216	Satt114	Sct_001	Satt431	Satt038	GMABAB	Satt042
1	BRSGO740SRR	244	142	206	200	131	200 / 245	76 / 139	192 / 200	200	170	167	170
2	BRSGO760SRR	248	138 / 142	200 / 218	174	131 / 137	245 / 194	139	192	227 / 230	200	158	-
3	BRSGO8360	244	138	197 / 215	200	140	137 / 200	91	192	227 / 230	176	161	173
4	BRSGO Amaralina	244	142	206	208	131	245	76	192	191	173	158	170
5	BRSGO Ipameri	244	142	200	200	137	137	100	192	203	173	158	170
6	BRSGO Luziana	246	142	200	200	137	137	76	188	188	176	-	170
7	BRSGO MineirosRR	244	142	176	200	137	137	100	176	230	170	161	173
8	BRSGO Princesa	249	142 / 176	176	174	131	245	76	188	188	185	-	170
9	BRSParaiso	248	142	200	200	137	137	76	192	230	176	161	170
10	BRSRaissa	248	142	197	176	131	140	139	200	200	197	158	170
11	BRSTauraRR	248	142	200	200	137	137	100	202	230	173	161	170
12	BRSValiosaRR	244 / 248	142	200	200	131	140	76	200	200	176	158	170
13	BRSGO7960	248	142	176	202	131	137	76	176	188	176	161	170
14	BRSGO7561	244	142	197	200	131	161	73 / 91	192	230	170	155	173
15	BRS138	246	142	176	208	137	194	76	188	188	173	164	173
16	BRS244RR	242	142	197	208	137	191	91	192	230	170	-	170
17	BRSSilvaniaRR	248	176	176	200	137	140	91	176	200	176	161	170
18	BRSTordilhaRR	244	142	197	174	131	194	91	192	230	170	-	170
19	BRS8460RR	248	142	197	176	131	218	91	192	230	170	152	167
20	BRS8560	248	142	206	200	137	140	76	188	188	170	158	170
21	BRSFepagro24	246	140	197	-	137	140	91	188	188	170	-	170
22	BRSCambona	244	142	176	200	131	140	76	176	230	170	158	170
23	BRSEstanciaRR	248	142	197	176	137	161	91	188	188	-	-	170
24	BRSMG790 A	242	176	176	176	131	140	91	192	230	170	-	170
25	BRSMG800 A	244	142	206	176	131	140	91	192	200	170	161	173
26	BRS153	248	142	212	176	137	137	76	202	230	173	161	173
27	BRS7860	-	144	176	176	131	137	76	202	185	176	-	-

Quadro 4, Continuação...

Amostra	Cultivar	Sat_038	Sct_187	Satt181	Sat_085	Satt045	Satt216	Satt114	Sct_001	Satt431	Satt038	GMABAB	Satt042
28	BRS316RR	246	142	176	176	137	191	91	192	191	170	155	-
29	MG/BR46 (Conq.)	248	140	197	200	131	188	100	192	200	170	161	170
30	BRSMG68 [Venc.]	244	142	206	198	137	137	76	192	230	170	158	170
31	BRSTertuliaRR	250	140	176	200	131	137	76	192	200	-	-	170
32	BRSPampaRR	248	142	206	210	-	194	91	188	188	-	-	173
33	BRSMG752s	246	176	176	176	137	140	91	192	200	176	173	170
34	BRS245RR	-	142	206	210	137	191	91	192	230	-	-	173
35	BRSMG811C	-	142	206	200	137	140	76	192	200	170	161	170
36	BRSGO7560	246	142	209	-	-	194	91	170	-	-	-	170
37	BRSMG750s	242	142	176	176	137	191	91	192	230	170	158	170
38	BRSSinuelo	248	142	176	200	131	218	118	188	188	-	161	173
39	BRS137	248	142	176	200	131	137	76	188 / 192	188	-	158 / 185	170
40	BRSPala	242	142	215	200	131	218 / 220	91	202	230	170	155 / 182	170
41	BRS205	248	142	176	174 / 200	131 / 137	194	91	188	188	-	161	170
42	BRS154	248	142	215	200	137	137	76	192	230	173	161	170
43	BRS266 [Quer.]	248	142 / 154	200	200	137	194 / 220	91	188 / 200	188	-	158	170
44	BRS211	246	142	206 / 209	185 / 174	131 / 142	137 / 149	76	192	230	-	161 / 170	164
45	BRS8660	248	142	212 / 215	-	131	191	76	188	188	176	161	167
46	BRSTebana	248 / 252	142	215 / 221	200	137	137	88 / 100	202	227	170	182	173
47	BRSGO8060	252	142	218 / 221	200	137	194	88 / 91	178 / 192	230	173	158	170
48	BRS8160RR	246	142	206	200	131	191	76	192	200	-	161	170

(-) Dados perdidos.

Quadro 4, Continuação...

Amostra	Cultivar	Satt233	Sat_105	Sat_064	Satt540	Satt002	Satt005	Satt612	Satt046	Satt100	Satt079	Satt070	Satt586
1	BRSGO740SRR	198	265	148	-	138	168	244	176	144	144	145	220
2	BRSGO760SRR	207	235	142 / 154	153 / 159	138	156	235	200	159	142	160	205
3	BRSGO8360	198	272	150	150	135	162	226 / 229	176 / 182	156 / 159	139 / 148	160 / 172	214 / 217
4	BRSGO Amaralina	198	235	150	150	126	162	235	176	150	142	151	199
5	BRSGO Ipameri	192	235	144	150	129	147	244	176	150	142	151	202
6	BRSGO Luziana	198	272	154	150	138	162	235	176	150	139	163	202
7	BRSGO MineirosRR	186	272	142	150	138	184	235	176	150	148	172	199
8	BRSGO Princesa	186	285	142	159	135	147	235	173	144	139	145	211
9	BRSParaiso	198	263	140	150	138	162	229	176	150	142	145	202
10	BRS Raissa	198	199	-	159	126	162	235	176	150	148	151	202
11	BRSTauraRR	198	263	148	150	126	162	235	176	150	205	163	205
12	BRS ValiosaRR	186	265	154	147	138	162	235	176	150	142	151	193
13	BRSGO7960	198	265	142	153	135	156	235	176	144	148	145	211
14	BRSGO7561	198	235	-	165	-	159	235	176	144	142	163	202
15	BRS138	186	263	140	165	129	156	244	176	144	142	145	211
16	BRS244RR	198	265	140	168	129	181	229	176	144	142	145	211
17	BRSSilvaniaRR	207	263	-	153	138	159	229	176	138	130	163	199
18	BRSTordilhaRR	198	173	-	153	129	165	235	176	144	148	175	211
19	BRS8460RR	186	263	144	165	138	159	235	176	144	148	145	202
20	BRS8560	198	291	142	153	129	147	235	176	144	-	145	211
21	BRSFepagro24	198	237	136	165	129	159	235	176	144	148	145	199
22	BRSCambona	207	272	-	159	129	181	235	176	144	142	172	199
23	BRSEstanciaRR	198	235	-	165	129	165	235	176	141	202	175	202
24	BRSMG790 A	198	261	150 / 152	165	129	159	229	176	144	163	163	223
25	BRSMG800 A	186	235	-	168	138	159	229	176	141	163	169	211
26	BRS153	201	-	140	165	129	147	229	-	-	148	145	211
27	BRS7860	201	235	-	-	129	-	235	176	144	148	145	199
28	BRS316RR	198	-	140 / 142	159	129	-	235	176	144	202	172	199

Quadro 4, Continuação...

Amostra	Cultivar	Satt233	Sat_105	Sat_064	Satt540	Satt002	Satt005	Satt612	Satt046	Satt100	Satt079	Satt070	Satt586
29	MG/BR46 (Conq.)	186	265	142	153	129	-	235	176	141	139	145	202
30	BRSMG68 [Venc.]	198	-	140	153	129	184	235	176	144	142	145	193
31	BRSTertuliaRR	186	-	-	153	138	184	235	176	144	148	145	211
32	BRSPampaRR	198	235	140	159	138	181	229	176	144	-	145	211
33	BRSMG752s	198	265	152	-	138	-	244	176	-	144	175	196
34	BRS245RR	186	235	142	168	-	-	235	176	144	-	145	211
35	BRSMG811C	186	-	142	153	135	-	226	-	144	139	145	211
36	BRSGO7560	201	265	142	168	-	-	229	176	144	142	175	211
37	BRSMG750s	207	235	144	147	129	-	235	176	144	-	145	211
38	BRSSinuelo	186	237	140	165	150	162	235	176	141	142	175	202
39	BRS137	186	272	140	153	132	184 / 187	235	176	144	148	172	211
40	BRSPala	198	233	140	165	138	181	235	176	144	139	145	211
41	BRS205	198 / 207	-	148	183	129	162	235	176	144	142	175	211
42	BRS154	198	265	144	165	129	147	235	176	144	148	163	211
43	BRS266 [Quer.]	198	235	144	147	132	147	235	176	144	142	175	199
44	BRS211	198	235	144	183	129	162	235	182	144 / 156	142	145	199
45	BRS8660	198	287	146 / 148	159	129	162	244	176	144 / 156	148	145	211
46	BRSTebana	186	235	140	147	123	177 / 181	244	176	144	142	145	205
47	BRSGO8060	186	235	144	156	129	156	244	176	144	142	145	211
48	BRS8160RR	186	263	144	153	135	150	235	176	144	142	145	202

\* (-) Dados perdidos.

As diferenças genéticas entre as cultivares foram distinguíveis por meio do comprimento dos fragmentos amplificados, identificados em forma de picos nos eletroferogramas, como pode ser exemplificado na figura 1.

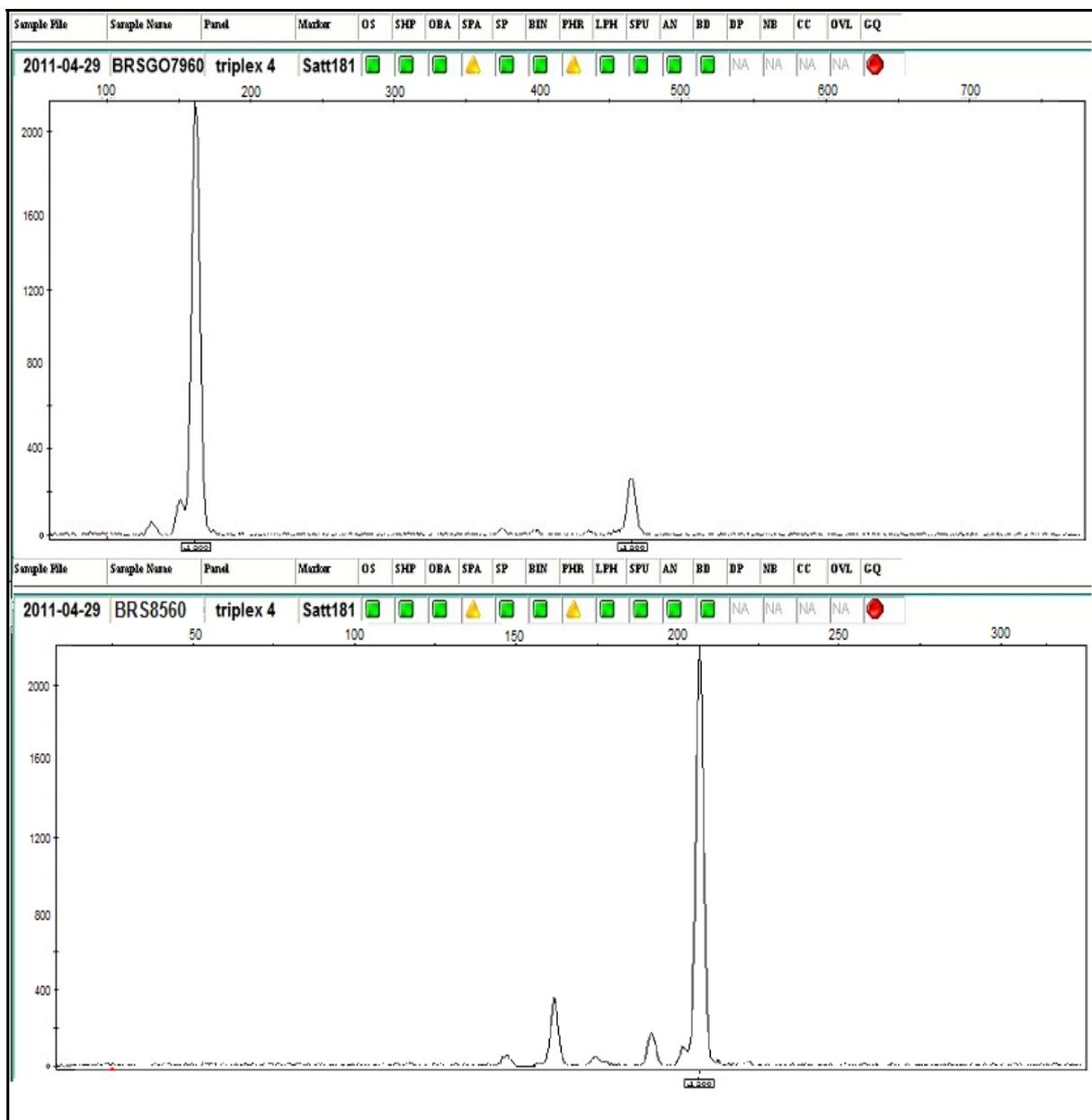


Figura 1- Ilustração do modo de detecção dos alelos pelo sequenciador automático ABI3130xl. São ilustrados dois alelos do loco Satt181. Na cultivar BRSGO7960 o alelo 176pb e na cultivar BRS8560 o alelo 206pb.

O número de alelos presentes nos marcadores microssatélites variou de 4 a 12, como ilustrado na figura 2. Foram observados 173 alelos nas 48 cultivares, tendo uma média de 7,17 por locus. As frequências alélicas variaram de 0,02 a 0,92 e 59,8% dos alelos foram considerados raros por apresentar frequência alélica inferior

a 0,1. Passianotto (2010) identificou 201 alelos num grupo de 48 cultivares de soja, sendo o número de alelos encontrados de 6 a 12, com média de 8,73. Desse total de alelos identificados, 41,8% foram considerados raros.

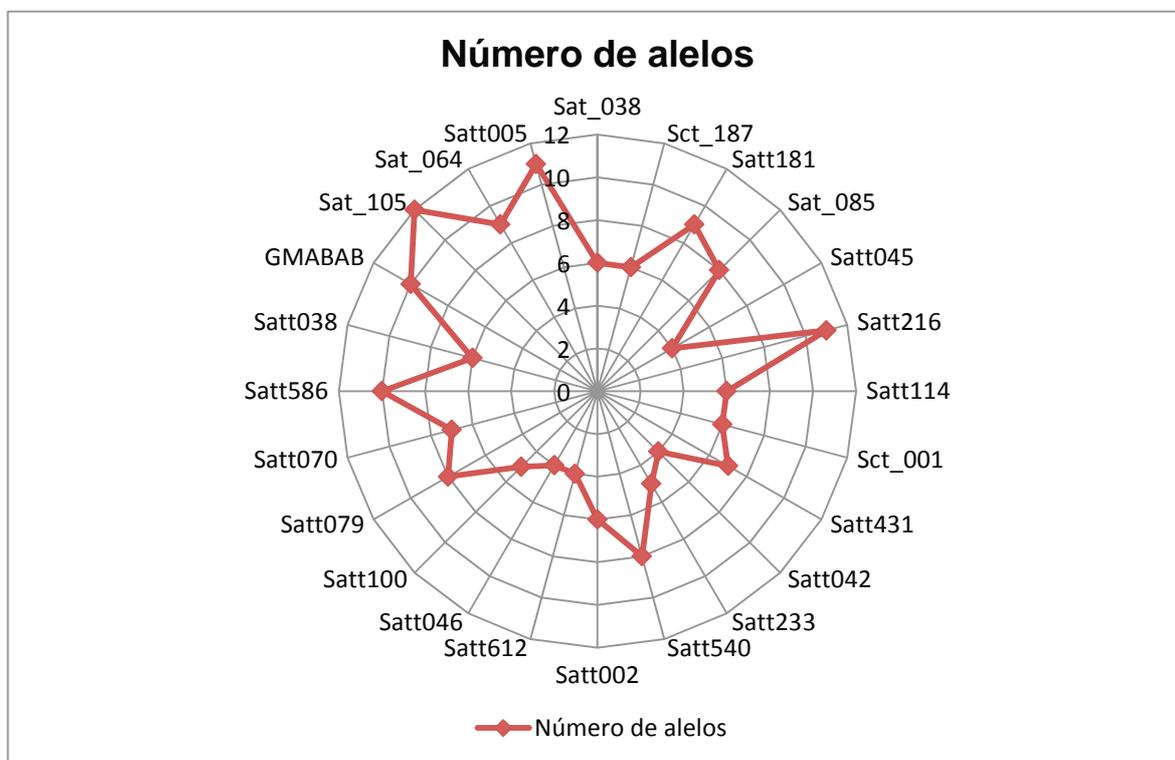


Figura 2- Número de alelos observados nos 24 marcadores microssatélites analisados nas 48 cultivares de soja.

Os valores de PIC variaram de 0,16 (Satt046) a 0,85 (Satt005 e Satt216), com média de 0,66. Apenas quatro *primers* apresentaram um PIC menor de 0,5. Todos os outros apresentaram um valor superior indicando alto nível polimórfico (Quadro 5). Do grupo de 23 marcadores microssatélites utilizados por Passianotto (2010), apenas os Satt009 e o Satt288 não foram utilizados no estudo, sendo substituídos por Satt216, Sat\_105 e Satt038. Porém todos os 21 SSR apresentaram uma diversidade genética que variaram de 0,55 a 0,85, com média de 0,75.

Essa variação no PIC entre os dois estudos, embora tenham sido utilizados os mesmos marcadores pode estar relacionado as diferenças genéticas existentes entre as cultivares selecionadas para o estudo, mesmo que façam parte de um mesmo banco de germoplasma.

Do grupo de marcadores utilizados no presente estudo, oito (Sat\_085, Satt070, Satt079, Satt114, Satt181, Satt233, Satt431 e Satt540) também foram

utilizados por Oliveira et al. (2010) que observaram PIC superior a 0,5 para esses marcadores. Foi observada uma frequência alélica semelhante entre esses marcadores, porém com pequenas diferenças.

Essas diferenças pode se dar em função da diversidade genética entre as cultivares utilizadas entre os dois estudos, pois quanto maior for a diversidade genética maior é a probabilidade de detectar outros alelos aumentando a informatividade genética de cada marcador. Os nossos dados corroboram com os apresentados por Oliveira et al. (2010) o que indica ser um grupo de marcadores com grande potencial de discriminação em diferentes cultivares de soja.

O mesmo pôde ser observado em trabalho realizado por Vieira et al. (2009), que ao avaliar a variabilidade genética entre 53 cultivares de soja, utilizando 53 marcadores microssatélites polimórficos, obtiveram estimativas de PIC variando de 0,16 a 0,66 entre as cultivares, com média de 0,47. Nesse caso, foram identificados 124 alelos, com média de 2,34 e as frequências alélicas variaram entre 0,02 a 0,91, com média de 0,43.

Dos 53 marcadores microssatélites utilizados pelos autores, seis foram utilizados nesse estudo (Satt181, Satt540, Satt233, Satt070, Satt431 e Sat\_085). Os 53 marcadores microssatélites avaliados apresentaram elevada informatividade sendo possível identificar uma significativa variabilidade entre cultivares. Apesar dos resultados demonstrarem um PIC menor que 0,50 esses valores podem ser explicados em função da análise de polimorfismo ter sido realizada em gel de agarose e não utilizando sequenciador automático, tornando impossível o reconhecimento de diferenças menores do que dez pares de base.

A partir dos alelos identificados em cada marcador foi possível identificar o perfil mínimo de marcadores moleculares que discriminaram o grupo das 48 cultivares. Visando estabelecer esse grupo mínimo de SSR diferenciadores, foram selecionados aqueles que não apresentaram nenhuma falha na amplificação e apresentassem um maior número de alelos diferenciadores.

Quadro 5- Número de alelos, frequências alélicas e conteúdo informativo polimórfico dos 24 marcadores microssatélites, obtidas a partir dos perfis genéticos de 48 amostras de cultivares de soja

Marcador	N de alelos	Alelos	Frequência	PIC
Sat_038	6	242	0,09	0,7
		244	0,24	
		246	0,17	
		248	0,46	
		250	0,02	
		252	0,02	
Sct_187	6	138	0,04	0,31
		140	0,02	
		142	0,83	
		144	0,02	
		154	0,02	
		176	0,08	
Satt181	9	176	0,28	0,83
		197	0,17	
		200	0,13	
		206	0,19	
		209	0,04	
		212	0,06	
		215	0,11	
		218	0,02	
		221	0,02	
Sat_085	8	174	0,11	0,68
		176	0,21	
		184	0,02	
		198	0,02	
		200	0,51	
		202	0,02	
		208	0,06	
		210	0,04	
Satt045	4	131	0,46	0,54
		137	0,50	
		140	0,02	
		143	0,02	
Satt216	11	137	0,26	0,85
		140	0,19	
		149	0,02	
		161	0,04	
		188	0,02	
		191	0,11	
		194	0,15	
		200	0,04	
		218	0,06	
		220	0,04	
		245	0,09	

Quadro 5, Continuação...

Marcador	N de alelos	Alelos	Frequência	PIC
Satt114	7	73	0,02	0,68
		76	0,38	
		88	0,02	
		91	0,40	
		100	0,10	
		118	0,02	
		139	0,06	
Sct_001	6	170	0,02	0,69
		176	0,10	
		188	0,23	
		192	0,48	
		200	0,08	
		202	0,10	
Satt431	7	185	0,02	0,75
		188	0,25	
		191	0,06	
		200	0,20	
		203	0,04	
		227	0,06	
		230	0,37	
Satt042	4	164	0,02	0,44
		167	0,04	
		170	0,72	
		173	0,22	
Satt233	5	186	0,31	0,63
		192	0,02	
		198	0,51	
		201	0,06	
		207	0,10	
Satt540	8	147	0,09	0,83
		150	0,15	
		153	0,24	
		156	0,02	
		159	0,15	
		165	0,22	
		168	0,09	
		183	0,04	
Satt002	7	123	0,02	0,69
		126	0,06	
		129	0,45	
		132	0,04	
		135	0,11	
		138	0,30	
		150	0,02	
Satt612	4	226	0,04	0,54
		229	0,18	
		235	0,63	
		244	0,14	

Quadro 5, Continuação...

Marcador	N de alelos	Alelos	Frequência	PIC
Satt046	4	173	0,02	0,16
		176	0,92	
		182	0,04	
		200	0,02	
Satt100	6	138	0,02	0,49
		141	0,08	
		144	0,69	
		150	0,17	
		156	0,04	
		139	0,13	
Satt079	8	131	0,02	0,73
		139	0,13	
		142	0,40	
		145	0,04	
		148	0,29	
		163	0,04	
		202	0,04	
		205	0,02	
Satt070	7	145	0,49	0,71
		151	0,08	
		160	0,04	
		163	0,12	
		169	0,02	
		171	0,10	
		174	0,14	
Satt586	10	193	0,06	0,76
		196	0,02	
		199	0,18	
		202	0,20	
		205	0,06	
		211	0,40	
		214	0,02	
		217	0,02	
		220	0,02	
		223	0,02	
Satt038	6	170	0,49	0,67
		173	0,19	
		176	0,24	
		185	0,03	
		197	0,03	
		200	0,03	
GMABAB	10	152	0,03	0,72
		155	0,08	
		158	0,31	
		161	0,41	
		164	0,03	
		167	0,03	
		170	0,03	

Quadro 5, Continuação...

Marcador	N de alelos	Alelos	Frequência	PIC
GMABAB	10	173	0,03	
		182	0,05	
		185	0,03	
Sat_105	12	173	0,02	0,81
		199	0,02	
		233	0,02	
		235	0,33	
		237	0,05	
		261	0,02	
		263	0,14	
		265	0,19	
		273	0,12	
		285	0,02	
		287	0,02	
Sat_064	9	291	0,02	0,82
		136	0,02	
		140	0,26	
		142	0,23	
		144	0,19	
		146	0,02	
		148	0,09	
		150	0,07	
		152	0,05	
Satt005	11	154	0,07	0,85
		147	0,14	
		150	0,02	
		156	0,10	
		159	0,14	
		162	0,26	
		165	0,05	
		168	0,02	
		177	0,02	
		180	0,12	
		184	0,10	
Média	7,17		0,14	0,66

Dos 24 marcadores microssatélites analisados, um número mínimo de cinco marcadores (Satt216, Satt586, Satt233, Satt181 e Satt070) contribuiu com a discriminação total do grupo, demonstrando ser altamente informativos (Quadro 6).

Algumas cultivares, como exemplo a MG/BR46, um único marcador (Satt216) foi capaz de diferenciá-la, porém em outras cultivares, como a BRSParaíso, foram necessários os cinco SRR diferenciadores. Os números de alelos que se encontram em negrito, representam o fim do conjunto mínimo capaz

de diferenciar a respectiva cultivar. Nos casos em que uma determinada cultivar apresentou mais de um alelo em um loco, as frequências de ambos foram mantidas (dados duplicados apresentados no Quadro 6).

Em estudos realizados por Passianotto (2010), foi identificado no grupo de 23 marcadores microssatélites, seis capazes de discriminar um grupo de 48 cultivares de soja, sendo o Sat\_038 considerado mais informativo (78% de poder discriminatório), seguido por Satt612, Satt181, Satt540, Satt009 e Satt005. Dentre os marcadores discriminatórios identificados por Passianotto (2010) e o grupo discriminatório relatado no presente estudo, apenas o Satt181 foi identificado em comum.

Embora o Sat\_038 não tenha entrado como um dos marcadores diferenciadores no presente estudo, os alelos (244 e 248) encontrados em ambos os trabalhos representaram uma frequência alélica de 70% nas cultivares. Os outros alelos, exceto o 246, que teve uma frequência de 17%, foram considerados alelos raros devido à ocorrência ser inferior a 0,1. A informação de presença de alelos raros deve ser utilizada de forma conservadora, uma vez que é necessário uma repetibilidade desses valores, e por esse motivo não podem exclusivamente ser considerados suficientes para discriminar um grupo.

Em trabalho realizado por Oliveira et al. (2010), os autores utilizaram 48 marcadores microssatélites para caracterizar 32 cultivares de soja, e o Satt216 foi o marcador microssatélite que apresentou maior número de alelos (sete) e um PIC de 0,59. Nesse grupo de 48 marcadores utilizados por Oliveira et al. (2010), nove foram utilizados no presente estudo e quatro fazem parte do grupo mínimo de SSR diferenciadores. O Satt216 identificou 11 alelos diferentes, apresentando um PIC de 0,85, demonstrando ser altamente polimórfico.

Outros marcadores também contribuíram para discriminar as 48 cultivares, porém foi estabelecido um grupo mínimo, com elevada informatividade capaz de identificar uma significativa variabilidade entre cultivares. Esses marcadores adicionais com poder discriminatório são de suma importância, pois quanto maior o grupo de marcadores informativos, maior é a chance de discriminar uma nova cultivar.

Quadro 6- Conjunto mínimo de marcadores diferenciadores

SSR diferenciadores						
n°	Cultivar	Satt216	Satt586	Satt233	Satt181	Satt070
30	BRSMG68	137	<b>193</b>	198	206	145
7	BRSGOMineirosRR	137	199	<b>186</b>	176	171
44*	BRS211	137/149	199	<b>198</b>	206/209	145
27	BRS7860	137	199	<b>201</b>	176	145
5	BRSGOIpameri	137	202	<b>192</b>	200	151
9	BRSParaiso	137	202	198	200	<b>145</b>
6	BRSGOLuziana	137	202	198	200	<b>163</b>
46*	BRSTebana	137	205	<b>186</b>	215/221	145
11	BRSTauraRR	137	205	<b>198</b>	200	163
31	BRSTertuliaRR	137	211	186	176	<b>145</b>
39	BRS137	137	211	186	176	<b>171</b>
13	BRSGO7960	137	211	198	<b>176</b>	145
42	BRS154	137	211	198	<b>215</b>	163
26	BRS153	137	211	<b>201</b>	212	145
3*	BRSGO8360	137/200	214/217	198	197/215	160/171
12	BRSValiosaRR	140	<b>193</b>	186	200	151
33	BRSMG752s	140	<b>196</b>	198	176	174
21	BRSFepagro24	140	199	<b>198</b>	197	145
17	BRSSilvaniaRR	140	199	207	176	<b>163</b>
22	BRSCambona	140	199	207	176	<b>171</b>
10	BRSRaissa	140	<b>202</b>	198	197	151
35	BRSMG811C	140	211	186	206	<b>145</b>
25	BRSMG800A	140	211	186	206	<b>169</b>
20	BRS8560	140	211	<b>198</b>	206	145
24	BRSMG790A	140	<b>223</b>	198	176	169
14	BRSGO7561	161	202	198	197	<b>163</b>
23	BRSEstanciaRR	161	202	198	197	<b>174</b>
29	MG/BR46	<b>188</b>	202	186	197	145
28	BRS316RR	191	<b>199</b>	198	176	171
48	BRS8160RR	191	<b>202</b>	186	206	145
34	BRS245RR	191	211	<b>186</b>	206	145
16	BRS244RR	191	211	198	<b>197</b>	145
45*	BRS8660	191	211	198	<b>212/215</b>	145
37	BRSMG750s	191	211	<b>207</b>	176	145
43	BRS266	194	<b>199</b>	198	200	174
2*	BRSGO760SRR	194/245	<b>205</b>	207	200/218	160
15	BRS138	194	211	186	<b>176</b>	145
47*	BRSGO8060	194	211	186	<b>218/221</b>	145
18	BRSTordilhaRR	194	211	198	<b>197</b>	174
32	BRSPampaRR	194	211	198	<b>206</b>	145
36*	BRSGO7560	194	211	<b>201</b>	206/209	174
1	BRSGO740SRR	200/245	<b>221</b>	198	206	145
38	BRSSinuelo	218	202	186	<b>176</b>	174
19	BRS8460RR	218	202	186	<b>197</b>	145
40	BRSPala	218/221	<b>211</b>	198	215	145
43	BRS266	221	<b>199</b>	198	200	174
4	BRSGO Amaralina	245	<b>199</b>	198	206	151
8	BRSGO Princesa	245	211	<b>186</b>	176	145

(\*) Cultivares que apresentaram dois alelos em cada marcador  
(n°) número adicionado a cultivar seguindo a sequência do quadro 4

Algumas cultivares incluídos nesse estudo apresentaram alta semelhança, com poucos alelos diferentes para os 24 marcadores avaliados. Essa similaridade pode ser visualizada através de uma análise de agrupamento, formada a partir de uma matriz de similaridade genética, que foi gerada baseada nos alelos encontrados para cada cultivar. O dendograma foi montado através do programa de clusterização NTSYSpc com o coeficiente Dice e o método hierárquico de Sahn (Figura 3).

As duas cultivares que mais se aproximaram foram a BRS Tertúlia e a BRS137, que se originaram a partir do cruzamento entre (Dourados 1 (5) x Ocepar 9) + (BR 16\*4 X GTS 40-3-2). Esse grupo apresenta o ancestral Hill em comum, e apresentou um coeficiente de similaridade de 71%. Esse resultado era esperado, uma vez que as duas se originaram de um mesmo ancestral e possuem os mesmos parentais, sendo consideradas cultivares irmãs.

Outras cultivares utilizadas nesse trabalho também apresentaram alta similaridade, mas devido a ausência de dados exatos de genealogia, não foi possível fazer uma correlação. É interessante ressaltar que a similaridade genética obtida por coeficiente de parentesco é baseada em probabilidades e aquela obtida por dados de marcadores moleculares é resultante da comparação direta dos alelos presentes nos *loci* avaliados. Estudos complementares são necessários para avaliar a genealogia das 48 cultivares genotipadas e com base nessas informações, inferir considerações que possam ser aventadas proximidade entre elas.

Após a identificação dos marcadores microssatélites diferenciadores, foram elaboradas as etiquetas genéticas para identificação das cultivares. Para tal, aos marcadores microssatélites utilizados no estudo, foram atribuídas letras para permitir uma diferenciação na fórmula genotípica da etiqueta genética (Quadro 7).

Quadro 7- Identificação dos marcadores microssatélites, respectivas letras atribuídas a cada um deles e suas identificações moleculares

<i>Locus</i>	Letra	<i>Locus</i>	Letra	<i>Locus</i>	Letra	<i>Locus</i>	Letra
Sat_038	A	Satt045	H	Satt612	N	Satt233	T
Satt005	B	GMABAB	I	Sct_187	O	Satt181	U
Sat_085	D	Satt042	J	Satt114	P	Satt070	V
Satt046	E	Satt431	K	Satt002	Q	Satt216	Z
Satt079	F	Satt586	L	Satt540	R	Satt038	W
Sct_001	G	Sat_064	M	Satt100	S	Sat_105	Y

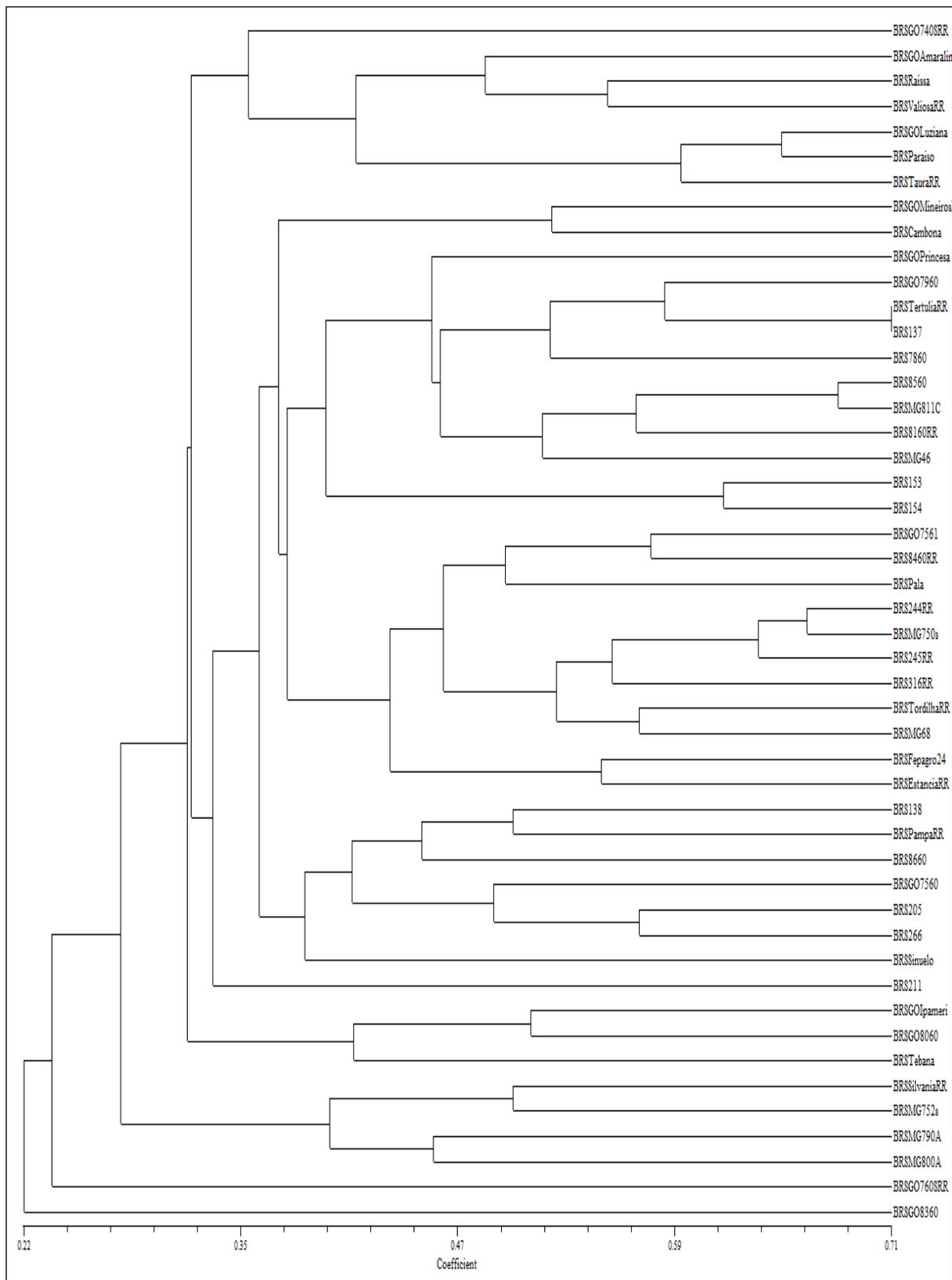


Figura 3- Análise de agrupamento feita pelo programa NTSYSpc utilizando o coeficiente Dice.

As cultivares receberam uma identificação molecular contendo informações dos marcadores diferenciadores com o tamanho dos alelos, em pares de base (pb), que foram subscritos ao lado das letras (Quadro 8). Como exemplo, se os marcadores A, B e C, tiver os alelos 144, 200 e 194, a fórmula genotípica da mesma será  $A_{144}B_{200}C_{194}$ . Essa, portanto, será a etiqueta genética da cultivar em questão.

Quadro 8- Etiquetas genéticas elaboradas com base nas análises das 48 cultivares de soja com os cinco SSR diferenciadores

Cultivar	SSR diferenciadores				
	Satt586	Satt233	Satt181	Satt070	Satt216
BRSGO740SRR	L <sub>221</sub>	T <sub>198</sub>	U <sub>206</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>200/245</sub>
BRSGO760SRR	L <sub>205</sub>	T <sub>207</sub>	U <sub>200/218</sub>	V <sub>160</sub>	Z <sub>194/245</sub>
BRSGO8360	L <sub>214/217</sub>	T <sub>198</sub>	U <sub>197/215</sub>	V <sub>160/171</sub>	Z <sub>137/200</sub>
BRSGO Amaralina	L <sub>199</sub>	T <sub>198</sub>	U <sub>206</sub>	V <sub>151</sub>	Z <sub>245</sub>
BRSGO Ipameri	L <sub>202</sub>	T <sub>192</sub>	U <sub>200</sub>	V <sub>151</sub>	Z <sub>137</sub>
BRSGO Princesa	L <sub>211</sub>	T <sub>186</sub>	U <sub>176</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>245</sub>
BRSRaissa	L <sub>202</sub>	T <sub>198</sub>	U <sub>197</sub>	V <sub>151</sub>	Z <sub>140</sub>
BRSGO7960	L <sub>211</sub>	T <sub>198</sub>	U <sub>176</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>137</sub>
BRS138	L <sub>211</sub>	T <sub>186</sub>	U <sub>176</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>194</sub>
BRSSilvaniaRR	L <sub>199</sub>	T <sub>207</sub>	U <sub>176</sub>	V <sub>163</sub>	Z <sub>140</sub>
BRSTordilhaRR	L <sub>211</sub>	T <sub>198</sub>	U <sub>197</sub>	V <sub>174</sub>	Z <sub>194</sub>
BRS8460RR	L <sub>202</sub>	T <sub>186</sub>	U <sub>197</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>218</sub>
BRS8560	L <sub>211</sub>	T <sub>198</sub>	U <sub>206</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>140</sub>
BRSFepagro24	L <sub>199</sub>	T <sub>198</sub>	U <sub>197</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>140</sub>
BRSMG790A	L <sub>223</sub>	T <sub>198</sub>	U <sub>176</sub>	V <sub>169</sub>	Z <sub>140</sub>
BRSMG800A	L <sub>211</sub>	T <sub>186</sub>	U <sub>206</sub>	V <sub>169</sub>	Z <sub>140</sub>
BRS7860	L <sub>199</sub>	T <sub>201</sub>	U <sub>176</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>137</sub>
BRS316RR	L <sub>199</sub>	T <sub>198</sub>	U <sub>176</sub>	V <sub>171</sub>	Z <sub>191</sub>
MG/BR 46	L <sub>202</sub>	T <sub>186</sub>	U <sub>197</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>188</sub>
BRSMG68	L <sub>193</sub>	T <sub>198</sub>	U <sub>206</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>137</sub>
BRSTertuliaRR	L <sub>211</sub>	T <sub>186</sub>	U <sub>176</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>137</sub>
BRSPampaRR	L <sub>211</sub>	T <sub>198</sub>	U <sub>206</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>194</sub>
BRSMG752s	L <sub>196</sub>	T <sub>198</sub>	U <sub>176</sub>	V <sub>174</sub>	Z <sub>140</sub>
BRSMG811C	L <sub>211</sub>	T <sub>186</sub>	U <sub>206</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>140</sub>
BRSGO7560	L <sub>211</sub>	T <sub>201</sub>	U <sub>206/209</sub>	V <sub>174</sub>	Z <sub>194</sub>
BRSSinuelo	L <sub>202</sub>	T <sub>186</sub>	U <sub>176</sub>	V <sub>174</sub>	Z <sub>218</sub>
BRS137	L <sub>211</sub>	T <sub>186</sub>	U <sub>176</sub>	V <sub>171</sub>	Z <sub>137</sub>
BRSPala	L <sub>211</sub>	T <sub>198</sub>	U <sub>215</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>218/221</sub>
BRS266	L <sub>199</sub>	T <sub>198</sub>	U <sub>200</sub>	V <sub>174</sub>	Z <sub>221</sub>
BRS211	L <sub>199</sub>	T <sub>198</sub>	U <sub>206/209</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>137/149</sub>
BRS8660	L <sub>211</sub>	T <sub>198</sub>	U <sub>212/215</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>191</sub>
BRSTebana	L <sub>205</sub>	T <sub>186</sub>	U <sub>215/221</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>137</sub>
BRSGO8060	L <sub>211</sub>	T <sub>186</sub>	U <sub>218/221</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>194</sub>
BRS8160RR	L <sub>202</sub>	T <sub>186</sub>	U <sub>206</sub>	V <sub>145</sub>	Z <sub>191</sub>

Dados da literatura demonstram a utilização dos marcadores microssatélites na caracterização molecular de cultivares de soja. Oliveira et al. (2010) utilizaram 32 cultivares de soja que foram analisadas com 48 marcadores microssatélites genotipados em sequenciador automático. Após cálculo das frequências alélicas foi possível identificar um número mínimo de 13 marcadores que foram capazes de discriminar todo o material com uma certeza de 99,99%, demonstrando que o método é eficiente e preciso.

Para obter essa precisão e validar as leituras, é necessário que as amostras contra-prova sejam genotipadas e comparadas com as amostras prova, demonstrando um alto nível de precisão e repetibilidade dos resultados.

O presente estudo contribui para aumentar o número de cultivares caracterizadas e complementa estudos anteriores que também caracterizaram cultivares de soja do banco de Germoplasma da Embrapa Soja (Passianotto, 2010). Um conjunto maior de marcadores microssatélites deve ser identificado como informativos, aumentando o grupo discriminatório de marcadores e assim, gerar um banco de dados capaz de caracterizar de forma inequívoca as cultivares de soja de uso no país. Como consequência desse mecanismo de elevada precisão na identificação molecular, as etiquetas genéticas geradas poderão ser utilizadas para combater o uso ilegal de sementes, análise de pureza genética em lotes de sementes e na proteção intelectual dos obtentores.

## 5. CONCLUSÕES

- a) Os marcadores moleculares microssatélites são ferramentas importantes para a caracterização de cultivares de soja, tendo em vista seu alto nível de polimorfismo e repetibilidade.
- b) A metodologia utilizada demonstrou-se eficiente na análise de cultivares de soja sendo identificados cinco marcadores microssatélites com potencial discriminatório capazes de diferenciar todas as 48 cultivares.
- c) Os dados de informatividade dos marcadores avaliados e suas etiquetas formadas serão incluídos no banco de dados junto com dados gerados anteriormente (Passianotto, 2010) e com os perfis genéticos das cultivares analisadas poderão contribuir para o registro e proteção destas. Essas informações são extremamente importantes, uma vez que, esses marcadores podem ser selecionados para futuras análises de caracterização de novas cultivares de soja.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOOR, R.V.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree data. **Revista Brasileira de Genética**, 18:265-273, 1995.

AGRIANUAL 2012. **Anuário da Agricultura Brasileira**. In: Comunicação/FNP Consultoria e Comércio (17ed.) São Paulo: Agros Comunicação/FNP Consultoria e Comércio, 2012. p. 433-465.

ALCÂNTARA NETO, F. **Marcadores microssatélites na identificação de cultivares de soja**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 46p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento).

ALCÂNTARA NETO, F. **Caracterização genético-molecular de um banco ativo de germoplasma de soja**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 75p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).

ANDERSON, J.A. CHURCHILL, G.A.; AUTRIQUE, J.E.; TANKSLEY, S.D. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome**, 36:181-186, 1993.

BAYLE, D.C. Isozymic variation and plant breeders rights. In: S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds.). **Isosymes in Plant Genetics and Breeding**. Elsevier: Amsterdam, 1983. p. 425-440.

BERNACCHI, D.; BECK-BUNN, T.; EMMATTY, D.; ESHED, Y.; INAI, S.; LOPEZ, J.; PETIARD, V.; SAYAMA, H.; UHLIG, J.; ZAMIR, D.; TANKSLEY, S.D. Advanced back cross QTL analysis of tomato. II-Evaluation of near iso genic lines carrying single-don or introgressions for desirable wild QTL alleles derived from *Lycopersiconhirsutum* and *L. pimpinellifolium*. **Theoretical Applied Genetics**, 97:170-180, 1998.

BERNARDO, R. Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. **Crop Science**, 48:1649-1664, 2008.

BONETTI, L.P. Distribuição da Soja no Mundo. Origem, História e Distribuição. In: MIYASAKA, S.; MEDINA (eds.). **A soja no Brasil**. J.C. Campinas: ITAL, 1981. p.1-6.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. 2ª ed. Viçosa: UFV, 2009. 532p.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 5ª ed. Viçosa: UFV, 2009. p.441-442.

BURTON, J.W. Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Field Crops Research**, 53:171-186, 1997.

BLAKENEY, M. Recent developments in intellectual property and power in the private sector related to food and agriculture. **Food Policy**, 36:109-113, 2011.

BLAIR, M.; MUNOZ, M.; PEDRAZA, F.; GIRALDO, M.; BUENDIA, H.; HURTADO, N. Quantitative trait *loci* for root architecture traits correlated with phosphorus acquisition in common bean. **Genome**, 52:772-782, 2009.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C. **Aplicação de tecnologias genômicas baseadas em marcadores microssatélites para discriminação de cultivares e análise de pureza genética em feijoeiro comum**. 1ª impressão. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão - Comunicado Técnico, 132:1-4, 2006.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Folha de Viçosa, 2009. p.11-78.

CAO, D.; OARD, J.H. Pedigree and RAPD-based DNA analysis of commercial U.S. Rice cultivars. **Crop Science**, 37:1630-1635, 1997.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos-safra 2011/2012, Quarto levantamento**. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos\\_08.09.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos_08.09.pdf). Acesso em: 08, fevereiro, 2012.

COSTA, J.A. **Cultura da soja**. Porto Alegre: Evangraf, 1996. 234 p.

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

DIWAN, N.; CREGAN, P.B. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. **Theoretical Applied Genetics**, 95:723-733, 1997.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. accuracy assessment. **Genome Research**, 8:175-185, 1998.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: MA/Embrapa/Cenargen, 1998. 204p.

GARCIA, A.F.; ALBERINI, J.L.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P. Microsatellite molecular markers in the cultivar identification of brazilian soybean for human consumption. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 7:155-164, 2007.

GRANT, D.; NELSON, R.T.; CANNON, S.B. SHOEMAKER, R.C. Soybase the USDA-ARS soybean genetics and genomics database. **Nucleic Acids Research**, 38: 843-846, 2010.

HASSE, G. Soja no Brasil. In: HASSE, G. **O Brasil da Soja: Abrindo fronteiras, semeando cidades**. Porto Alegre: L&PM Eds, 1996. p. 135-148.

HYTEN, D.L.; HARTMAN, G.L.; NELSON, R.L. Map location of the *Rpp1* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, 47:837–840, 2007.

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

KAISER, R.J.; MACKELLAR, S.L.; VINAYAK, R.S.; SANDERS, J.Z.; SAAVEDRA, R.A.; HOOD, L.E. Specific-primer-directed DNA sequencing using automated fluorescence detection. **Nucleic Acids Research**, 17:6087-6102, 1989.

KEIM, P.; OLSON, T.C.; SHOEMAKER, R.C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. **Soybean Genetics Newsletter**, 15:150-152, 1988.

LANZA, M.A.; SCHUSTER, I.; GUIMARÃES, C.T. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, 21:97-108, 2000.

LEAL, A.A.; MANGOLIN, C.A.; AMARAL JUNIOR, A.T.; GONÇALVES, L.S.A.; SCAPIM, C.A.; MOTT, A.S.; ELOI, I.B.O.; CORDOVÉS, V.; SILVA, M.F.P. Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among popcorn lines. **Genetics and Molecular Research**, 1:9-18, 2010.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advances in Agronomy**, 55:265-343, 1995.

LEMOIS, N. G.; BRACCINI, A.L.; ABDELNOOR, R.V.; OLIVEIRA, C.N.; SUENAGA, K.; YAMANAKA, N. Characterization of genes *Rpp2*, *Rpp4*, and *Rpp5* for resistance to soybean rust. **Euphytica**, 182:53-64, 2011.

LIGHTFOOT, D.A.; MEKSEM, K.; ZHANG, H.B. An integrated physical and genetic map for the soybean genome. In: Summaries of legume genomics projects from around the globe. Community resources for crops and models. Van den Bosch K. and G Stacey (eds.). **Plant Physiology**, 131:840-865, 2003.

LIMA, V.L.A.; SEKI, H.A.; RUMJANEK, F.D. Microsatellite polymorphism in wheat from Brazilian cultivars; inter and intra-varietal studies. **Genetics and Molecular Biology**, 26:349-353, 2003.

MANIATIS, T.; JEFFREY, A.; VAN DE SANDE, H. Chain Length Determination of Small Double and Single-Stranded DNA Molecules by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **Biochemistry**, 14:3787-3794, 1975.

MEDINA, J.C. Introdução e Evolução da Soja no Brasil. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. (eds.). **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 17-20.

MILLACH, S.C.K. Marcadores de DNA em plantas. In: MILLACH, S.C.K., (Ed.). Porto Alegre: **UFRGS**, 1998. 141p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Sumário Executivo Complexo Soja: 2010/2011**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 9, janeiro, 2012.

MOREIRA, C.T.; SOUZA, P.I.M.; FARIAS NETO, A.L.; ALMEIDA, L.A. **Ocorrência de variações na coloração do hilo de sementes de cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]**. Planaltina: Embrapa Cerrados (Comunicado Técnico, 5), 1999. 4p.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, 3:75-182, 1993.

NARVEL, J.M.; FEHR, W.R.; CHU, W.C.; GRANT, D.; SHOEMAKER, R.C. Simple sequence repeat diversity among soybean plant introductions and elite genotypes. **Crop Science**, 40:1452-1458, 2000.

OLIVEIRA, M.B.; VIEIRA, E.S.N.; SCHUSTER, I. Construction of molecular database for soybean cultivar identification in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, 9:705-720, 2010.

PASSIANOTTO, A.L.L. **Identificação molecular de cultivares de soja (*Glycine max* L. Merrill) utilizando um sistema semi-automatizado de genotipagem**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2010. 47p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

PENNER, G.A.; ZHENG, Y.; BAUM, B. Identification of DNA Fingerprints for two-row barley cultivars registered in Canada. **Genome**, no prelo, 1998.

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

RABEL, M.; VIEIRA, E.S.N.; LANA, U.G.P.; SEHNEN, M.A.S.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares microssatélites na avaliação de sementes de soja com variação na coloração do hilo. **Revista Brasileira de Sementes**, 32:19-25, 2010.

RODRIGUES, D.H.; ALCÂNTARA-NETO, F.; SCHUSTER, I. Identification of essentially derived soybean cultivars using microsatellite markers. Brazilian Society of Plant Breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 8:74-78, 2008.

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**, 39:247-253, 2004.

SCHUSTER, I.; VIEIRA, E.S.N.; PADILHA, L. Marcadores moleculares no pós-melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. p.205-230.

SCHUSTER, I.; VIEIRA, E.S.N.; PADILHA, L. Marcadores moleculares no pós-melhoramento. In: **Marcadores moleculares**. 2 ed. Viçosa: Folha de Viçosa, 2009. p. 177-208.

SCHLESINGER, S. **O grão que cresceu demais: a soja e seus impactos sobre a sociedade e o meio ambiente**. Rio de Janeiro: FASE, 2006. 51p.

SCHLÖTTERER, C.; WIEHE, T. Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. (eds.). **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford: University Press, 1999. p. 238-247.

SCHLOTTERER, C. The evolution of molecular marker – just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, 5:63-69, 2004.

SCHULMAN, A.H. Molecular markers to assess genetic diversity. **Euphytica**, 158:313-321, 2007.

SILVA, D.C.G.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R.L.; ARIAS, C.A.A.; NEPOMUCENO, A.L.; MAURO, A.D.; PEREIRA, S.S.; NOGUEIRA, L.M.; PASSIANOTTO, A.L.L.; ABDELNOOR, R.V. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical Applied Genetics**, 117:57-63, 2008.

SMITH, J.S.C.; SMITH, O.S. Fingerprinting crop varieties. **Advances in Agronomy**, 47:85-140, 1992.

SNPC–Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. **MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 8, setembro, 2010.

SONG, Q.J., QUIGLEY, C.V.; NELSON, R.L.; CARTER, T.E.; BOERMA H.R.; STRACHAN, J.L.; CREGAN, P.B. A selected set of trinucleotide simple sequence repeat markers for soybean cultivar identification. **Plant Varieties and Seeds**, 12:207-220, 1999.

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 and Applied Genetics**, 109:122-128, 2004.

TRIPP, R.; LOUWAARS, M.; EATON, D.P. Plant variety protection in developing countries. A report from the field. **Food Policy**, 32:354-371, 2007.

VIEIRA, E.S.N.; SCHUSTER, I.; SILVA, R.B.; OLIVEIRA, M.A.R. Variabilidade genética em cultivares de soja obtida com marcadores microssatélites genotipados em géis de agarose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 44:1460-1466, 2009.

WANG, X.L.; YANG, R.H.; YAO, Y.J. Development of microsatellite markers for *Ophiocordyceps sinensis* (Ophiocordycipitaceae) using an ISSR-TAIL-PCR method. **American Journal of Botany**, p. 1-4, 2011.

WEIR, B.S. Genetic data analysis methods for discrete genetic data Sinauer Association. **Sunderland: Massachusetts**, 1990. p. 445.

WU, X.; ZHONG, G.; FINDLEY, S.D.; CREGAN, P.; STACEY, G.; NGUYEN, H.T. Genetic marker anchoring by six-dimensional pools for development of a soybean physical map. **BMC Genomics**, 2008. p. 28.