

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

| | |
|---|-------------|
| RESUMO | VIII |
| ABSTRACT | IX |
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 12 |
| 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 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 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 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 27 |
| 5. CONCLUSÕES | 46 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 47 |

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[®] 3130xl and the GeneMapper[®] 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 Distinguibilidade, 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 $(AT)_n$ em plantas é a mais abundante, sendo que em soja as sequências (classes) mais frequentes de SSR são $(AT)_n$ e $(ATT)_n$ (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 V₃ 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⁻¹ 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⁻¹. 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^y</i> | Sequência (5'-3') | Motif ² | Natureza | Alelo da Williams 82 ⁴ | Fluorescência ^{5/} | Referência |
|--------------|----------------------|---|--------------------|----------|-----------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Sat_038 | 10 | F – GCGTCGCAACTTTTTTCATTTTTCTTACT R – GCGAGTTCTTTTAACAACACTCACTTTT | (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 ^{1/} | Seqüência (5'-3') | Motif ² | Natureza | Alelo da Williams 82 ⁴ | Fluorescência ^{5/} | Referência |
|---------|-----------------|--|--------------------|----------|-----------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Satt070 | 14 | F – TAAAAATTTAAATACTAGAAGACAAC 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) |

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

² Motif = número de repetições de nucleotídeos.

Trinucleotídeo ou Dinucleotídeo.

⁴ Alelo presente na cultivar Williams 82:

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

⁵ 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 MgCl₂, 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 | BRSGOAmaraIina | 198 | 235 | 150 | 150 | 126 | 162 | 235 | 176 | 150 | 142 | 151 | 199 |
| 5 | BRSGOIpameri | 192 | 235 | 144 | 150 | 129 | 147 | 244 | 176 | 150 | 142 | 151 | 202 |
| 6 | BRSGOLuziana | 198 | 272 | 154 | 150 | 138 | 162 | 235 | 176 | 150 | 139 | 163 | 202 |
| 7 | BRSGOMineirosRR | 186 | 272 | 142 | 150 | 138 | 184 | 235 | 176 | 150 | 148 | 172 | 199 |
| 8 | BRSGOPrincesa | 186 | 285 | 142 | 159 | 135 | 147 | 235 | 173 | 144 | 139 | 145 | 211 |
| 9 | BRSParaíso | 198 | 263 | 140 | 150 | 138 | 162 | 229 | 176 | 150 | 142 | 145 | 202 |
| 10 | BRSRaissa | 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 | BRSSaliosaRR | 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.

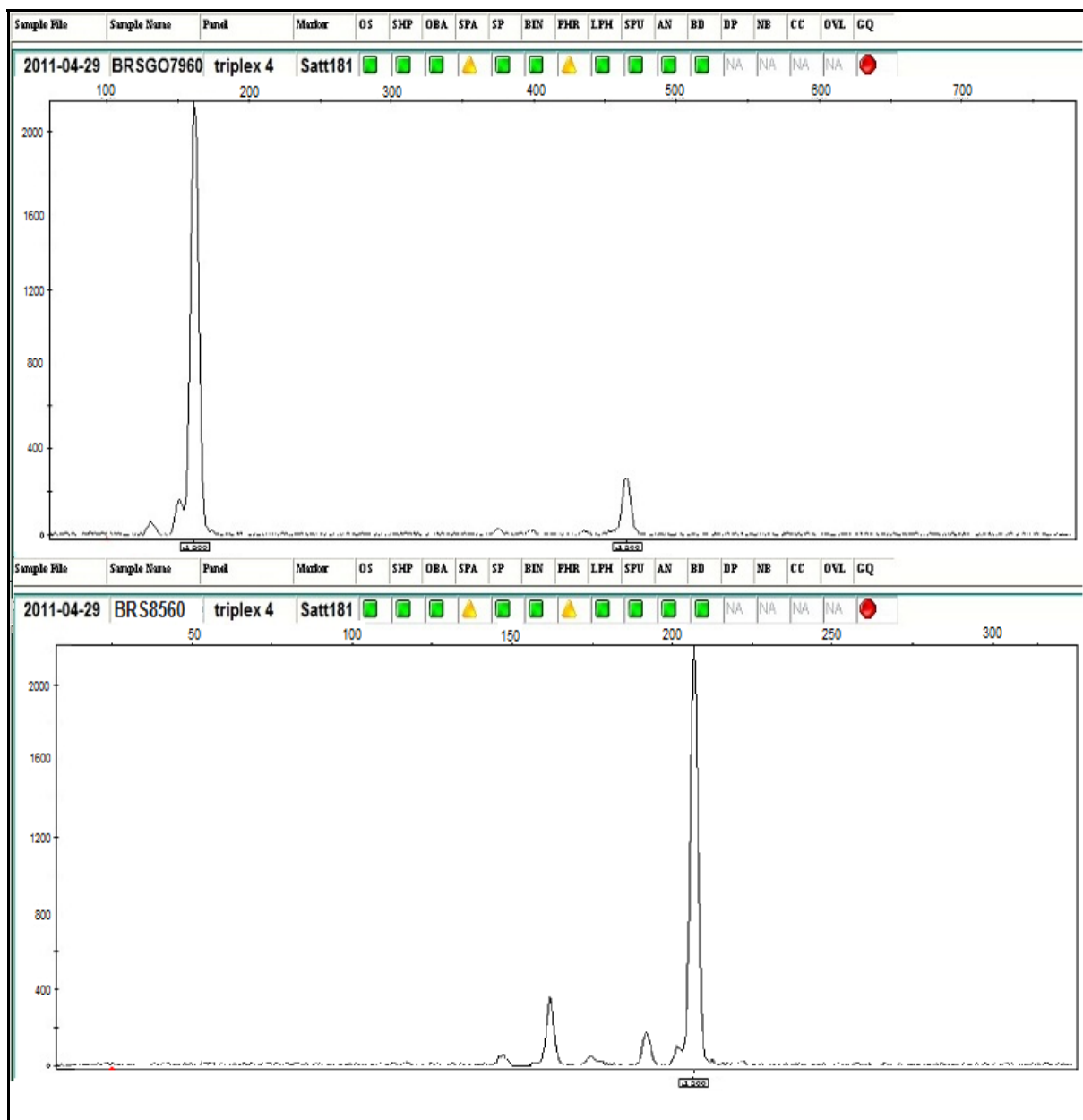


Figura 1- Ilustração do modo de detecção dos alelos pelo sequenciador automático ABI3130xl. São ilustrados dois alelos do loco Satt181. Na cultivar BRSGO7960 o alelo 176pb e na cultivar BRS8560 o alelo 206pb.

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.

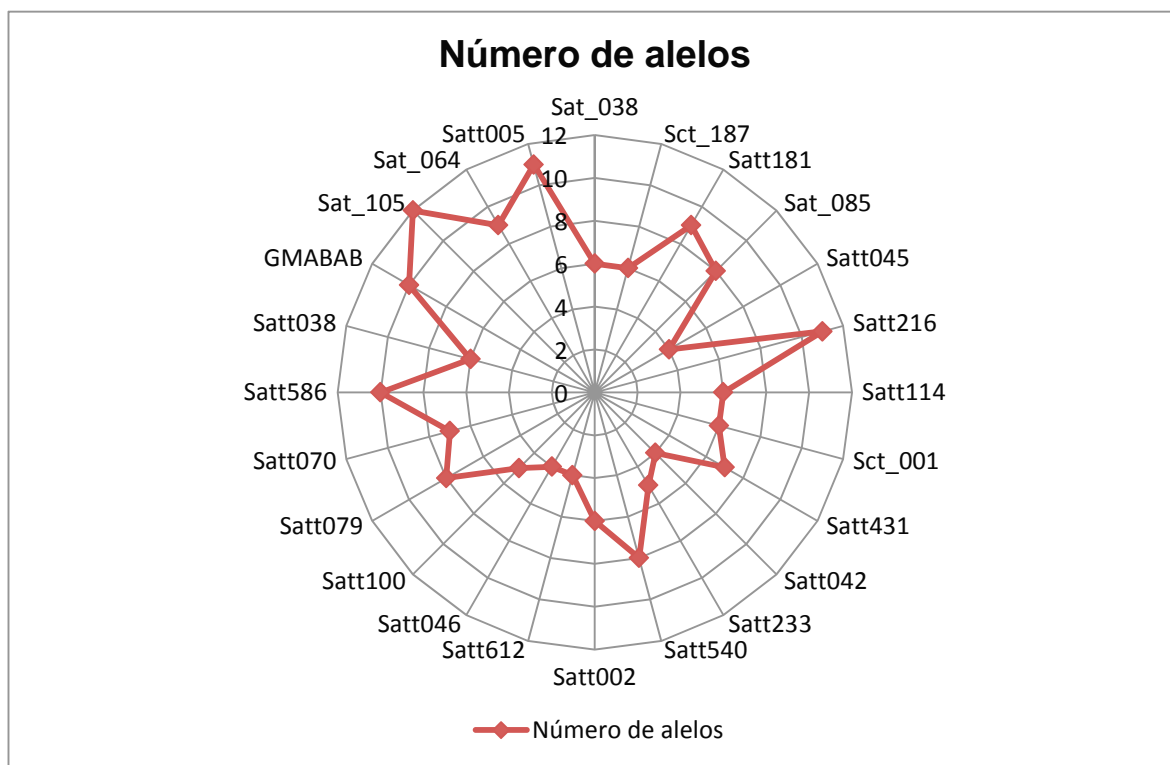


Figura 2- Número de alelos observados nos 24 marcadores microssatélites analisados nas 48 cultivares de soja.

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

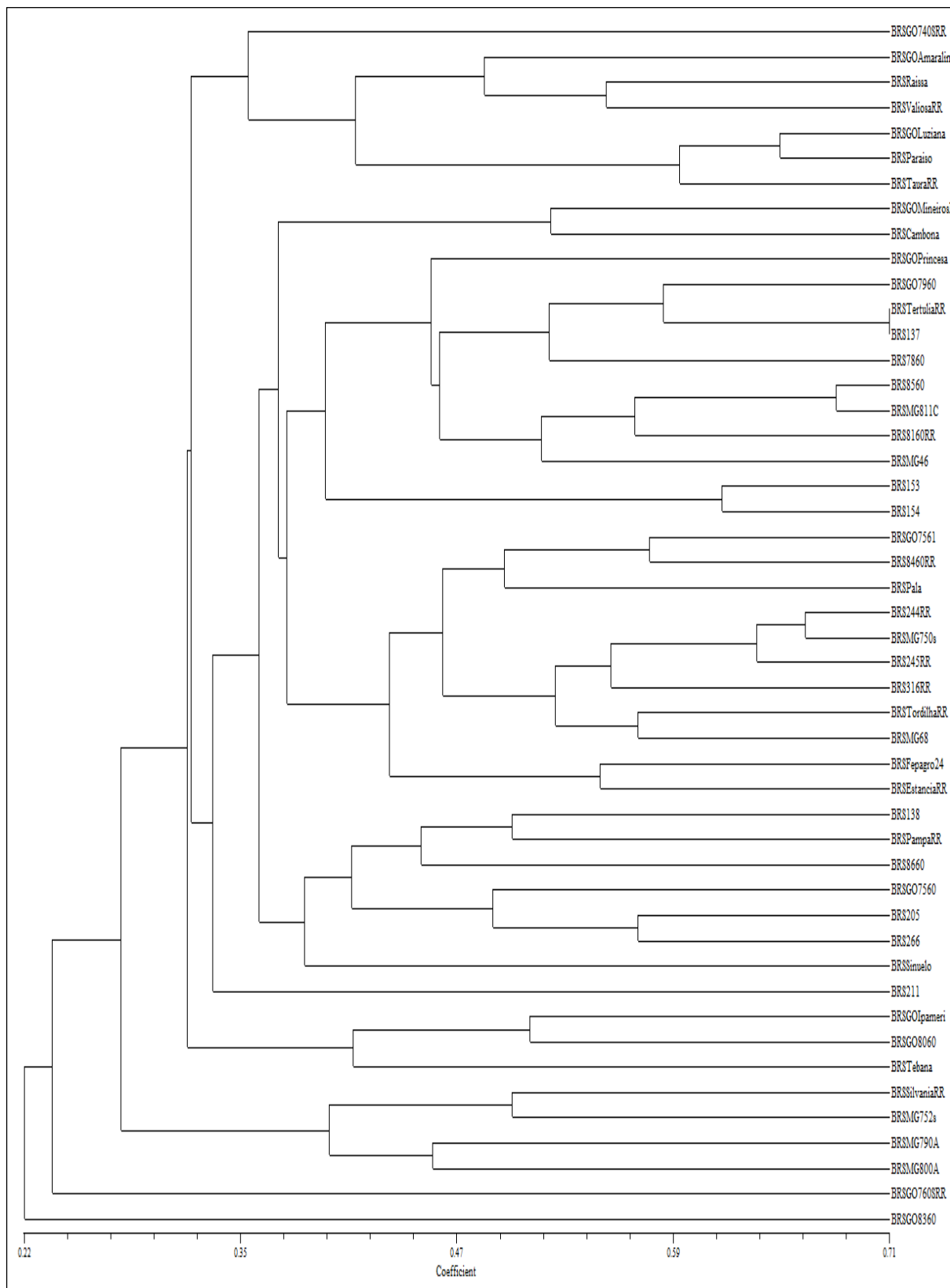


Figura 3- Análise de agrupamento feita pelo programa NTSYSpc utilizando o coeficiente Dice.

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

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. 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.

LEMO, 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 SANDET, 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: BOREM, 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.