

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

ANDRÉ LUIZ DE LIMA PASSIANOTTO

**Identificação molecular de cultivares de soja (*Glycine max* L.
Merrill) utilizando um sistema semi-automatizado de genotipagem**

**MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO - 2010**

ANDRÉ LUIZ DE LIMA PASSIANOTTO

Identificação molecular de cultivares de soja (*Glycine max* L. Merrill) utilizando um sistema semi-automatizado de genotipagem

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.

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Gonela.

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO – 2010

Aos meus pais, Angela Maria Lima Passianotto e Odair Passianotto, que me apoiaram e incentivaram em todos os degraus de minha vida. Sou extremamente grato a vocês.

À minha irmã, Maria Luiza de Lima Passianotto, por fazer parte da minha vida e me compreender em todos os momentos.

A toda a minha família que sempre me apoiou.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela maior graça dada a uma pessoa, a vida.

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

Ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pela disponibilização de estrutura física para a realização deste trabalho.

À professora doutora Adriana Gonela por me receber como orientado, por me ajudar em alguns percalços, pelos ensinamentos e pela imensa ajuda. Muito Obrigado.

À professora doutora Francismar Corrêa Marcelino, pelo apoio, pelos conselhos, ensinamentos e constante incentivo. Muito obrigado.

Ao professor doutor Ricardo Vilela Abdelnoor, pela ajuda no andamento do trabalho, pela disponibilidade e pelo imenso incentivo a minha pessoa. Muito Obrigado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas obrigado pelas discussões, conselhos e incentivo.

Aos pesquisadores da Embrapa, doutor Álvaro M. R. Almeida, doutor Eliseu Bineck, doutor Carlos Alberto Arrabal Arias, doutor Milton Kaster, doutor José Ubirajara Vieira Moreira e doutor Marcelo Fernandes de Oliveira, pelo apoio técnico-científico e pelo incentivo.

À Embrapa – Milho e Sorgo, em especial à pesquisadora Cláudia Teixeira Guimarães, pela disponibilização do Laboratório e de toda infra-estrutura para realização do experimento e ao estagiário Carlos, por me auxiliar na condução das análises desenvolvidas na Embrapa- Milho e Sorgo.

Aos estagiários que fazem parte do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa-Soja, Amanda Paiva, Amanda Rusiska, Adriana Droval, Adriana Polizel, Cibelle, Cynara, Elton, Euziane, Fabiana, Glória, Guto, João Vitor, Joice, Josué, Ju, Juliane, Juliana Marcolino, Jakeline, Larissa, Leidy, Marcelão, Maria Cecília, Michelle, Mayra, Nori, Noelle Giacomini, Paulo Camargo, Paula, Renata Fuganti, Renata Stolf, Rodrigo, Salvador, Selma, Thiago e Valéria, pelo convívio, alegrias e aprendizado adquirido nesses anos.

Aos Técnicos do Laboratório, Silvana Marin, César Silveira, Nilson Vieira,

Vera Pieronte e Márcia Kuwahara, pela imensa ajuda que cada um deles disponibilizou para a realização deste trabalho. Muito Obrigado.

Agradeço, em especial, ao estagiário de Bio-Informática, Paulo Silla, pela ajuda na análise dos dados.

Aos Amigos Leandro Tellini, Lucas Ponte Baldin, Guilherme Zamarian, Guilherme Toledo, Luis Fernando Storti e Carlos Oliveira, pelos momentos de descontração e pelas discussões travadas, todas elas muito interessantes.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Vegetal Francisco José da Cruz e Maria Valquíria Magro, pelo indispensável auxílio.

Aos amigos do programa de Pós-Graduação, por tudo o que passamos nesses dois anos de luta. Muito Obrigado a vocês pela ajuda.

À minha namorada, Thayse Maria Marestoni, pela imensa ajuda nas discussões sobre o trabalho, pelas inúmeras idéias, revisões, a imensa compreensão, ajuda e carinho disponibilizado a mim, mesmo nos momentos mais difíceis da realização das atividades. Sem sua companhia, tudo teria sido muito mais difícil.

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

BIOGRAFIA

ANDRÉ LUIZ DE LIMA PASSIANOTTO, filho de Angela Maria Lima Passianotto e Odair Passianotto, nasceu em Rancharia, estado de São Paulo, aos vinte e um dias do mês de maio de 1984.

Iniciou o Ensino Fundamental, em 1991, na Escola Estadual *Dom Antonio José dos Santos*. Em 1993, passou a estudar no Colégio *Criativo* de Rancharia e, em 1996, transferiu-se para o Colégio *Diocesano Santo Antonio*, em Assis, estado de São Paulo, finalizando essa etapa escolar em 1998.

Em 1999, iniciou o Ensino Médio também no Colégio *Diocesano Santo Antonio*, concluindo-o em 2001.

Graduou-se em Ciências Biológicas, em junho de 2007, pela Universidade Norte do Paraná – Campus Faculdades Luiz Meneghel, em Bandeirantes, Paraná.

Em março de 2008, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, da Universidade Estadual de Maringá.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Origem da soja (<i>Glycine max</i>).....	3
2.2. Introdução e expansão da soja no Brasil	4
2.3. Base genética da soja.....	5
2.4. Caracterização de cultivares.....	7
2.5. Propriedade intelectual dos obtentores vegetais	9
2.6. Marcadores moleculares.....	11
2.7. Marcadores moleculares microssatélites	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Material vegetal.....	14
3.2. Avaliação de características fenotípicas	15
3.3. Extração do DNA genômico.....	15
3.4. <i>Loci</i> microssatélites.....	16
3.5. Eletroforese em géis de poliacrilamida	16
3.6. Montagem do sistema de análise e reação de polimerase em cadeia (PCR)	17
3.7. Determinação dos <i>loci</i> microssatélites	19
3.8. Interpretação genética	19
3.9. Certificação das cultivares	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Características fenotípicas.....	22
4.2. Seleção dos <i>loci</i> microssatélites	23
4.3. Interpretação dos dados genotípicos	24
4.4. Análises de distinguibilidade.....	25
4.5. Etiqueta genética	31
5. CONCLUSÃO	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
APÊNDICES	44

RESUMO

PASSIANOTTO, André Luiz de Lima, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2010. **Identificação molecular de cultivares de soja (*Glycine max* L. Merrill) utilizando um sistema semi-automatizado de genotipagem.** Professora Orientadora: Adriana Gonela. Professores Conselheiros: Francismar Corrêa Marcelino, Ricardo Vilela Abdelnoor, Maria Celeste Gonçalves Vidigal, Pedro Soares Vidigal Filho.

A proteção de cultivares é realizada atualmente com base em descrições morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, características essas sensíveis às variações ambientais. Em se tratando de espécies autógamas e que apresentam baixa variabilidade genética, como no caso da soja, a distinção entre as cultivares utilizando os descritores citados acima demanda muito esforço e apresenta grandes limitações. Neste sentido, uma forma de se realizar a caracterização de um modo mais eficiente consiste na análise direta do DNA. Os marcadores moleculares são as ferramentas ideais para se realizar este tipo de abordagem, 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 co-dominantes. Este trabalho visou desenvolver um sistema semi-automatizado, pelo emprego de marcadores SSR fluorescentes, que permitisse distinguir geneticamente cultivares de soja. Para tanto, 48 cultivares de soja foram selecionadas no Banco de germoplasma da Embrapa-Soja. As sementes foram semeadas em vasos e mantidas em casa de vegetação até o surgimento do primeiro trifólio (estádio V₃) os quais foram coletados de cada cultivar pelo método de *bulk* e armazenadas a -80°C. Posteriormente, o DNA das amostras foi extraído e analisado utilizando, para tanto, 23 pares de primers microssatélites. As fitas senso dos primers selecionados foram marcadas com fluorescência azul (6FAM), verde (HEX), ou amarela (NED). As análises dos fragmentos gerados foram realizados em sequenciador automático ABI PRISM Genetic Analyser® 3100 (*Applied Biosystem*, Foster City, CA) e o software Genotyper® (AB-PEC, Foster City, CA) foi aplicado para a visualização exata dos alelos e para emissão de dados automaticamente. Os eletroferogramas obtidos permitiram a identificação dos *loci* mais informativos e de seus respectivos alelos. No total foram observados 201 alelos, com uma média de 8,73 alelos por *locus*. Os *loci* mais polimórficos foram Sat_038 e Satt009, com 12 alelos cada e os menos polimórficos foram

Satt042, Satt045, Satt002 e Satt233, apresentando seis alelos cada. Os *loci* Sat_038, Satt612, Satt181, Satt540, Satt009 e Satt005 foram capazes de identificar e diferenciar todo o grupo de 48 cultivares de soja estudadas, sendo denominados de *loci* diferenciadores. Com base nesses *loci* foi possível realizar a identificação dos genótipos e, conseqüentemente, a elaboração das etiquetas genéticas dos mesmos. 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*, microssatélites, validação.

ABSTRACT

PASSIANOTTO, André Luiz de Lima, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, February de 2010. **Molecular identification of soybean cultivars (*Glycine max* L. Merrill) with semi-automated system of genotyping by use SSR markers.** Adviser: Adriana Gonela. Committee members: Francismar Corrêa Marcelino, Ricardo Vilela Abdelnoor, Maria Celeste Gonçalves Vidigal, Pedro Soares Vidigal Filho.

The cultivar protection is realized based on morphological, physiological and biochemical descriptions, characteristics sensitive to environmental variations. When self pollinating species with low genetic variability are considered, as soybean, the distinction between cultivars using the standard traits demands lots of effort and it's not efficient. In this sense, one strategy to improve the characterization is to analyze directly the DNA. Molecular markers are ideal tools to perform this work, once they are not environmental sensitive and can be applied in any stage of plant development. Among molecular markers, microsatellites are distributed through all plant genome, specific, multiallelics and co-dominant. Therefore, by the above, this work aimed to develop a semi-automated system, by employing fluorescent SSR markers, that would allow genetically distinguish soybean cultivars. For this, forty – eight soybean cultivars were selected in the germoplasm bank from Embrapa – Soybean. Seed were germinated in pots and kept in green house until the first leaflet appearance (V_3 stage) which was collected from each cultivar in a bulk methodology and storage in -80°C . Posteriorly, DNA extraction was done and analyzed using 23 pairs of microsatellites primers. Sense strains were labeled with blue (6FAM), green (HEX) or yellow (NED) fluorescence. The analyses from results fragments was carried out in a automatic sequencer ABI PRISM Genetic Analyser[®] 3100 (*Applied Biosystem*, Foster City, CA) and the software GeneMapper[®] (AB-PEC, Foster City, CA) was applied to visualize the alleles exactly and to emit data automatically. The electroferograms obtained allowed the identification informative loci and its alleles. In total of 201 alleles were observed, with an average of 8.73 alleles per loci. The most informative loci were Sat_038 and Satt009, with 12 alleles each and the less

informative were Satt042, Satt045, Satt002 and Satt233 with six alleles each. The loci Sat_038, Satt612, Satt181, Satt540, Satt009 and Satt005 allowed the identification and differentiation of all group of the 48 soybean cultivars studied, being named loci differentiator. Based in these loci it was possible perform the identification of genotypes and consequently elaborate genetic tags. Such a system will be used in the characterization of new cultivars, assisting the protection procedure, as well as in cases to analyzed seed genetic purity when visual analyses were doubtful.

Key words: *Glycine max*, microsatellite, validation.

1. INTRODUÇÃO

No início do milênio a soja, *Glycine max* (L) Merrill, não passava de uma planta rasteira proveniente do leste asiático. Entretanto, hoje essa cultura destaca-se como uma das mais importantes para a agricultura brasileira e mundial (Embrapa, 2004). Sua expansão contribuiu, em parte, para crescimentos consideráveis em diversos setores, históricos e econômicos.

A cadeia agroindustrial da soja, no Brasil, gera milhões de empregos e participa com 27% do total de exportação gerada pela balança do agronegócio avaliado em mais de US\$ 63 bilhões (Conab, 2010a). A implantação desta cultura expandiu diversas fronteiras agrícolas até então estagnadas, contribuindo para uma elevação significativa na produção nacional, atribuindo ao país a posição de segundo maior produtor mundial do grão, sendo superado somente pelos Estados Unidos (USDA, 2010).

A produção mundial de soja na safra 2008/09 foi estimada em cerca de 210,6 milhões de toneladas cultivadas em uma área de 96,3 milhões de hectares, resultando numa produtividade média de 2.186 kg ha⁻¹ (USDA, 2010) O Brasil foi responsável por 27,1% dessa produção, totalizando 57,1 milhões de toneladas de soja, em 21,7 milhões de hectares, gerando uma produtividade média de 2.629 kg ha⁻¹ (Conab, 2010a).

O bom desempenho apresentado pelo Brasil deve-se primeiramente à grande quantidade de cultivares melhoradas existente, adaptadas a todas as regiões do país disponibilizadas por meio dos programas de melhoramento, os quais estão fundamentados na utilização da diversidade genética para a criação e a seleção de novas cultivares com alto potencial produtivo (Alcântara-Neto, 2001) e pelas tecnologias de produção de soja que são fundamentais para o correto gerenciamento de uma lavoura, visando a reduzir riscos e custos além de aumentar a produtividade (Embrapa, 2008).

A caracterização de cada genótipo é uma tarefa árdua e muitas vezes bem complexa. No Brasil, a lei de proteção de cultivares (nº 9.456) foi sancionada em abril de 1997, tendo sido seu Decreto regulamentador nº 2.366 publicado em novembro de 1997 e uma maior precisão na identificação de cultivares tornou-se

necessária a fim de garantir os direitos de propriedade do obtentor.

Até meados de 1960, a diferenciação de genótipos nos estudos de genética e melhoramento estava associada às características morfofenológicas das plantas. Porém, este método de análise tem como limitações as influências ambientais sobre o fenótipo, além do custo de uma mão de obra especializada (Sansavini, 1998). As cultivares apresentam um baixo polimorfismo entre as características morfofenológicas (Vinatzer et al., 1999) e uma abundância de polimorfismo de descritores morfológicos é potencialmente restrita em espécies de base genética estreita.

Com o objetivo de superar a limitação dos descritores morfológicos o emprego da técnica de natureza preditiva utilizando marcadores moleculares, visa à detecção da variação na seqüência de DNA – polimorfismos, permitindo a análise da similaridade genética existente (Vasconcelos et al., 1996). Dentre os marcadores moleculares utilizados, destacam-se os microssatélites, os quais constituem uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares disponíveis hoje (Borém e Caixeta, 2006). Esse alto nível de diversidade alélica possibilita a obtenção de polimorfismo em populações multiparentais e em populações derivadas de híbridos de genótipos relacionados, além de distinguir acessos de germoplasma diretamente relacionados (Borém e Caixeta, 2006).

A capacidade de identificar o perfil genético de uma cultivar fornece várias alternativas para problemas de identidade genotípica do material. A técnica de análise de microssatélites tem sido utilizada com sucesso para a geração de estimativas robustas de individualidade genética de plantas, animais e seres humanos (Alcântara-Neto, 2001).

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver um sistema semi-automatizado, de elevada precisão, por meio de marcadores SSR ('Simple Sequence Repeats') fluorescentes, obtendo dados para a identificação genética das cultivares de soja selecionada dentro do Banco de Germoplasma de Soja pertencentes à Embrapa–Soja, situada em Londrina – PR.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Origem da soja (*Glycine max*)

Originária da Ásia e conhecida há mais de três mil anos, a soja na época colonial foi cultivada em diferentes ambientes chineses, separados por cadeias montanhosas, o que contribuiu com a diversidade do germoplasma chinês (Chen e Nelson, 2005). Em toda a história da China, estendendo-se até os dias atuais, a soja tem sido o mais importante legume cultivado, sendo considerado essencial à existência da população e da civilização chinesa (Silva et al., 2004).

Durante séculos, o cultivo da soja permaneceu restrito apenas aos países orientais, onde foi utilizada principalmente para a produção de grãos que eram usados na preparação de grande variedade de alimentos frescos, fermentados e secos (Müller, 1981).

A partir do século XVII até o XIX, a produção de soja atingiu grandes proporções em diferentes países do Ocidente. Na França, a soja foi introduzida em 1739 por meio de sementes oriundas da China, sendo cultivada no Jardin des Plantes. Na Inglaterra, foi introduzida em 1790, sendo cultivada no Jardim Botânico Real em Kew (Morais e Silva, 1996)

A importância da soja aumentou a partir de 1900, quando se expandiu o intercâmbio com o Oriente, como no caso da primeira grande exportação para a Inglaterra em 1907 (Morais e Silva, 1996), e passou a ser utilizada como forrageira nos países orientais, mas o mesmo não ocorreu nos Estados Unidos.

Nas primeiras épocas de sua introdução nos Estados Unidos, a soja era utilizada como feno para o gado, adquirindo alguma importância como cultura forrageira a partir de 1880 e, por volta de 1890, a maioria das estações experimentais de agricultura tinham experimentos com a soja. Com todo esse avanço, começaram a ser desenvolvidos métodos de extração de óleo e uma porcentagem passou a ser colhida em grãos (Müller, 1981). Devido à modernização da pecuária européia, o continente se tornou um dos primeiros importadores de soja americana e, com o passar dos anos, a Europa bem como o Japão e os países do leste europeu aumentaram rapidamente suas importações (Müller, 1981).

2.2. Introdução e expansão da soja no Brasil

Em 1882, a soja foi introduzida na Bahia, por Gustavi D'Utra, sendo a referência mais antiga obtida na literatura. Da Bahia, foi levada a São Paulo (IAC, Campinas), apresentando os primeiros resultados experimentais em 1892.

A partir dos anos de 1960, a cultura se expandiu, inicialmente, em latitudes entre 30°S e 20°S, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo (Bonato, 2000). Nesta época, predominaram as introduções de cultivares e linhagens americanas, muitas das quais se tornaram importantes cultivares nessas regiões (Bonetti, 1983). Com a identificação de cultivares de melhor adaptação, os melhoristas passaram a combinar características destas por meio de hibridações (Bonetti, 1983). Assim, uma série de novas cultivares provenientes dos programas de melhoramento brasileiros contribuiu significativamente para a elevação dos índices de produtividade (Bonato, 2000).

Nesta mesma época, a soja começou a ser cultivada numa região de expansão, compreendendo latitudes menores que 20°S, abrangendo os estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Distrito Federal, Bahia e Maranhão. Segundo Kiihl et al. (1986), essa expansão foi favorecida pelo desenvolvimento de cultivares melhoradas e adaptadas a zonas equatoriais. Para tanto, procurou-se manter o mesmo tipo de soja utilizada no sul do país, alterando, principalmente, a resposta ao fotoperíodo, por meio da introdução de genes que retardam o florescimento.

Desta forma, o desenvolvimento de cultivares mais produtivas, estáveis e melhor adaptadas às diferentes condições de cultivos representou uma importante contribuição no estabelecimento da soja como uma das principais culturas do país (Almeida et al., 1997).

No entanto, foi no Rio Grande do Sul que se iniciou uma produção em escala comercial. Na safra 1976/77, o Paraná e o Rio Grande do Sul contribuíram com 31,7% e 50,2%, respectivamente, do total da soja produzida no Brasil, totalizando, somente na região Sul, 86,9% de toda soja produzida (Conab, 2010b).

A produtividade da soja, ao longo dos anos, evoluiu muito devido ao avanço das tecnologias de produção que foram adaptadas às condições tropicais e subtropicais do Brasil (Hasse e Bueno, 1996). Quando comparada com as demais

culturas brasileiras, a soja foi a que mais cresceu em área cultivada de pouco mais de 6 milhões de hectares na safra de 1976 para mais de 20 milhões de hectares na última safra (Conab, 2010b).

De acordo com Bertrand et al. (1987), a soja parece que se tornou, tanto quanto o petróleo, indispensável em nosso modelo ocidental de produção e consumo. Desde a introdução da soja em nosso país até os dias atuais, estudos confirmam as transformações que há mais de um século vêm modificando a nossa agricultura e nossa alimentação.

2.3. Base genética da soja

Segundo Tanksley e McCouch (1997), uma série de etapas pelas quais as espécies de plantas foram domesticadas não é exatamente conhecida. Entretanto a diversidade genética das espécies silvestres foi alterada radicalmente devido à pressão de seleção exercida pelo homem ao longo dos tempos.

Durante o último século, o desenvolvimento e sucesso dos métodos de melhoramento produziram variedades altamente produtivas e o processo de melhoramento de plantas ainda hoje é dependente dessa variabilidade gerada. Mas em diversos programas de melhoramento as novas variedades são obtidas a partir da hibridação entre um grupo de cultivares elite, geneticamente próximos. Sendo assim seu genótipo tende a ser muito semelhantes (Tanksley e McCouch, 1997; Bertini, 2004).

Estudos revelam que os métodos e práticas modernas de melhoramento podem reduzir a diversidade genética das plantas cultivadas, aumentando a vulnerabilidade ao ataque de pragas, patógenos e estresses ambientais (Vellvé, 1993; Clunies-Ross, 1995). Análises genealógicas em soja cultivada sugeriram que o germoplasma norte-americano foi reduzido em aproximadamente um quarto de sua base genética original em 50 anos de melhoramento (Gizlice et al., 1993).

Segundo Hiromoto e Vello (1986), os quatro ancestrais com maior contribuição para o germoplasma de soja brasileiro são os mesmos que mais contribuem para o germoplasma do sul dos Estados Unidos. Estimativas sobre a variabilidade genética da cultura têm destacado que o germoplasma brasileiro provém de base genética restrita, tendo se originado de poucas linhagens ancestrais (Priolli et al., 2004).

Segundo Keim et al. (1989), existem duas possíveis explicações para essa baixa diversidade genética no germoplasma da soja americana: a) por tratar-se de uma espécie autógama, em que os indivíduos são altamente homocigotos, mutações deletérias que contribuiriam para a diversidade genética são eliminadas por seleção; b) a maioria das cultivares existentes nos Estados Unidos apresentam ancestrais comuns, limitando, consideravelmente, a diversidade genética.

Williams et al. (1990a), trabalhando com marcadores moleculares RFLP, por intermédio da análise de 33 genótipos de soja, comprovaram a baixa diversidade do germoplasma norte-americano. Os autores verificaram que 46% dos *loci* estudados apresentavam o mesmo alelo, e dos *loci* restantes, considerados polimórficos, aproximadamente 25% apresentaram um tipo alélico presente em mais de 90% dos genótipos estudados.

Estudos sobre a base genética das cultivares brasileiras revelaram que o germoplasma utilizado em programas de melhoramento genético para esta espécie no país como um todo pode ser considerado como uma população de baixo tamanho efetivo (N=11 a 15) (Vello et al., 1988). Assim, apenas 11 ancestrais contribuíram com 89% do conjunto de genes do germoplasma de soja recomendado para cultivo em 1983/84 (Hiromoto e Vello, 1986). Nos Estados Unidos, uma situação semelhante foi observada, onde 25 ancestrais participaram de 90% do conjunto gênico das cultivares lançadas entre 1947 e 1988 (Gizlice et al., 1994). A estreita base genética apresentada, aliada à seleção das mesmas populações por um longo período de tempo, pode resultar na diminuição do progresso com seleção para produção de grãos e no aumento da vulnerabilidade genética a fatores bióticos e abióticos (Bratnagar, 1999).

Contudo, alguns programas de melhoramento contribuíram com heterogeneidade ao longo dos anos, possuindo objetivos determinados. De acordo com Sedyama et al. (1999), na década de 1970, o principal alvo dos programas de melhoramento de soja foi o desenvolvimento de plantas altas, mais tardias e resistentes à pústula bacteriana (*Xanthomonas phaseoli* pv. *glycines*). Na década de 1980, o objetivo principal foi a expansão das cultivares com período juvenil longo (PJL) e também resistentes à mancha-olho-de-rã, causada por *Cercospora sojina* Hara.

Na década de 1990, os programas se preocupavam em desenvolver cultivares resistentes ao cancro-da-haste, causado por *Diaporthe phaseolorum* f. sp.

meridionalis, ao nematóide-do-cisto, causado por *Heterodera glycines* Ichinohe e ao oídio, causado por *Microsphaera diffusa*. Com a ampliação do cultivo para áreas do cerrado brasileiro, o lançamento de novas cultivares pelas instituições públicas e privadas, principalmente nas décadas de 70, 80 e 90, pode ter possibilitado um equilíbrio entre os fatores que levariam à erosão genética. Uma análise mais detalhada da genealogia deste grupo de cultivares revelou que alelos de antigas cultivares (Santa Rosa, IAC 8, FT Cristalina, Paraná) foram preservados nas cultivares mais recentes, mas a variabilidade do grupo foi mantida pela introdução de outros materiais, como: Centennial, Stonewall, Forrest e algumas plantas introduzidas (PIs) mais resistentes a patógenos prejudiciais à cultura (Priolli et al., 2004).

2.4. Caracterização de cultivares

Os descritores morfológicos são tradicionalmente utilizados na caracterização de cultivares de soja como também de outras culturas. Até meados da década de 1960, a diferenciação de genótipos nos estudos de genética e melhoramento estava associada às características morfofenológicas das plantas. Contudo, dentro do gênero, as cultivares de soja possuem um baixo polimorfismo para tais características (Vinatzer et al., 1999).

Os descritores mínimos recomendados para soja constituem-se de características morfológicas a serem avaliadas nas sementes, plântulas e plantas adultas e, para fins especiais, avaliações adicionais como eletroforese de proteínas e enzimas (Brasil, 1997). Porém, este método de análise tem como limitações as influências ambientais sobre o fenótipo (Sansavini, 1998).

Atualmente, são usados cerca de 38 descritores entre os obrigatórios e os adicionais para diferenciar cultivares de soja de acordo com o SNPC (Sistema Nacional de Proteção de Cultivares). Entretanto, estes ainda são insuficientes para distinguir as cultivares, o que torna evidente a necessidade de ampliar a lista de descritores utilizados (Nogueira et al., 2008). Buscando superar este fator limitante, novos métodos de análise foram sendo introduzidos em auxílio à caracterização genética de cultivares.

Anti (2000), mediante análise isoenzimática, identificou diferenças entre duas cultivares por meio das isoenzimas fosfatase ácida, malato desidrogenase,

leucina aminopeptidase e urease. Entretanto, esta técnica não fornece polimorfismo suficiente para uma caracterização detalhada de genótipos de baixa variabilidade, não permitindo uma individualização, mas somente a separação em grupos (Arulsekar e Parfitt, 1986; Lima, 2001).

Apesar de recomendado, o emprego destes descritores apresenta algumas limitações como estarem vulneráveis ao efeito do meio ambiente, não serem estáveis e muitos só poderem ser avaliados na fase adulta das plantas, o que requer tempo e espaço físico para as avaliações (Vieira, 2000).

Há relatos de efeitos relacionados às diferenças genéticas para o comprimento do hipocótilo (Knittle e Burris, 1979; Nóbrega e Vieira, 1995). A variação no comprimento do hipocótilo tem sido atribuída às diferenças entre cultivares (Costa et al., 1999). Alguns autores concordam que sementes de maior tamanho originam plântulas com hipocótilo mais curto que sementes de tamanho menor (Costa et al., 1999), mas existem cultivares em que o comprimento do hipocótilo independe do tamanho da semente (Knittle e Burris, 1979).

As plantas de soja, ao longo do seu desenvolvimento, possuem quatro tipos distintos de folhas: as cotiledonares, as unifolioladas, as trifolioladas, que possuem tamanhos, formatos e posicionamentos diferentes e os prófilos, pequenos e pouco diferenciados (Müller, 1981). Com intuito de separar sementes que possuem os mesmos caracteres, Dorchester (1945) utilizou como características auxiliares a forma da base da folha unifoliolada (acunheada, troncada e auriculada), bem como a razão da maior largura da folha pelo comprimento, concluindo que a forma da folha apresenta características bem definidas, embora haja variação dentro de uma mesma cultivar.

Quando se utilizam marcadores moleculares, a possibilidade de identificação de genótipos aumenta consideravelmente (Mulcahy et al., 1993), pois a combinação de poucos marcadores é suficiente para diferenciá-los, produzindo um tipo de impressão digital molecular da planta, também conhecida como *fingerprinting* varietal, a qual é obtida a partir da análise do DNA das mesmas (Sansavini, 1998).

Entre os marcadores moleculares disponíveis atualmente para análise genética, estão os marcadores RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) (Botstein et al., 1980); RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) (Williams et al., 1990b); microssatélites (ou SSR – Sequências Simples

Repetidas) (Litt e Luty, 1989) e AFLP (Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos Amplificados) (Zabeau, 1993) entre outros.

Os marcadores microssatélites ou SSR se destacam, pois representam regiões de DNA de seqüências repetidas em número variável. Também apresentam como vantagens o caráter co-dominante, elevado polimorfismo e alta reprodutibilidade, características importantes para análise baseada em marcadores moleculares (Sansavini, 1998; Sosinski et al., 2000).

A técnica de análise de microssatélites tem sido utilizada com sucesso para a geração de estimativas consistentes de individualidade genética de plantas, animais e seres humanos (Alcântara-Neto, 2001). Devido à alta diversidade alélica por loco, marcadores microssatélites tem sido apontados como os mais informativos e tecnicamente adequados para estudos genéticos de espécies autógamas de estreita base genética, como a soja (Morgante e Olivieri, 1993).

O banco ativo de germoplasma de soja no Brasil está localizado na Embrapa Soja e contém aproximadamente 4.000 acessos. No Brasil, com a lei de proteção de cultivares, uma maior precisão na identificação de cultivares tornou-se necessária para garantir os direitos de propriedade do obtentor.

Nos Programas de Melhoramento Genético, a capacidade de identificar o perfil genético de uma cultivar fornece várias alternativas para problemas de identidade genotípica do material, bem como a identificação de contaminação de lotes de amostras através da mistura de materiais (Sosinski et al., 2000).

Esta estratégia reduz o tempo não só para desenvolver grandes populações segregantes por várias gerações, mas também para estimar parâmetros usados na seleção indireta (Borém e Caixeta, 2006).

2.5. Propriedade intelectual dos obtentores vegetais

Nos países onde vigoram as Leis de Proteção de Cultivares, o uso de marcadores moleculares tem tido grande importância na proteção do direito intelectual do melhorista (Lanza et al., 2000).

Com a aprovação em 25 de abril de 1997 da Lei nº 9.456 de Proteção de cultivares, o Brasil passou a contar com um novo mecanismo legal para proteger as variedades de plantas que apresentam, concomitantemente, características de

novidade, distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade genética (Brasil, 1997).

A Lei de Proteção de Cultivares fornece, finalmente, os mecanismos legais para que o obtentor tenha seu direito intelectual reconhecido possa recuperar razoavelmente os investimentos realizados e, ainda, sinta-se mais motivado a continuar com o processo criativo, com a possibilidade de reinvestimento na pesquisa. Além disso, com a adesão à convenção internacional para proteção de novas variedades vegetais, em sua versão revisada de 1978, o Brasil tornou-se o 43º país a fazer parte da UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants). Na prática, isso significa que o SNPC (Serviço Nacional de Proteção de Cultivares) obriga-se a acatar os requerimentos de pedidos de proteção de cultivares estrangeiras ou procedentes do exterior para as espécies em proteção no Brasil (SNPC, 1999).

Segundo Smith e Helentjaris (1996), três tendências atuais salientaram a necessidade crescente de se caracterizar e proteger as variedades de plantas, quais sejam:

- a) A constatação de redução na segurança do germoplasma devido à apropriação indevida.
- b) Os avanços dos marcadores moleculares e das possibilidades de transformação genética. A transformação e o retrocruzamento auxiliado por marcadores moleculares estão se tornando mais comuns nos programas de melhoramento do setor privado. Algumas mudanças genéticas podem ser apenas superficiais e representar tentativas de plagiar ou falsificar as variedades protegidas. Os marcadores moleculares permitem que se revele as diferenças entre as variedades, embora muitas diferenças possam ser insignificantes em termos fenotípicos.
- c) Tem havido aumento na competitividade, à medida que novas empresas têm iniciado seus programas de melhoramento de plantas, em grande parte por causa das novas oportunidades tecnológicas. Conseqüentemente, os melhoristas de plantas têm buscado o aperfeiçoamento das bases técnicas e legais de proteção.

Segundo Smith e Helentjaris (1996), metodologias detalhadas para caracterização de variedades são úteis para fortalecer a Propriedade Intelectual de Plantas, por meio de sua capacidade de fornecer identificação positiva do

germoplasma de interesse e para verificar a autenticidade dos “pedigrees”.

2.6. Marcadores moleculares

Com o rápido avanço tecnológico o uso de marcadores de DNA vem se tornando rotineiro nos programas de melhoramento genético de plantas, devido à sua simplificação e à redução de custos, proporcionando maiores ganhos genéticos nas principais culturas de interesse econômico (Milach, 1998).

Os marcadores moleculares são ferramentas úteis para detectar variações no genoma, aumentando o poder da análise genética das plantas. Este entre outros motivos tem despertado grande interesse no uso destas tecnologias. Para conseguir apreciar o potencial de utilização dos marcadores moleculares no dia-a-dia do melhoramento, é essencial que os melhoristas se familiarizem com essas tecnologias e que reconheçam as vantagens, limitações e aplicações de cada uma delas (Borém e Caixeta, 2006).

Atualmente, existe uma grande variedade de marcadores moleculares disponíveis para diferentes espécies vegetais (Borém e Caixeta, 2006). Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) (Botstein et al., 1980) e Minissatélites ou locos VNTR (Número Variável de Repetições em Tandem) (Jeffreys et al., 1985). Aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) (Williams et al., 1990b); SCAR (“*Sequence Tagged Sites*”) (Paran e Michelmore, 1993); microssatélites (ou SSR – Sequências Simples Repetidas) (Litt e Luty, 1989); e AFLP (Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos Amplificados) (Zabeau, 1993). As tecnologias de marcadores moleculares estão evoluindo rapidamente e as modificações já existem para algumas das técnicas acima mencionadas.

2.7. Marcadores moleculares microssatélites

Os genomas eucariotos são densamente povoados por seqüências simples

repetidas, as quais consistem de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem. Essas regiões são denominadas microssatélites, SSR ('Simple Sequence Repeats') ou STR ('Short Tandem Repeats') (Borém e Caixeta, 2006). Também foram encontrados com outras denominações na literatura, como SSLP ('Simple Sequence Length Polymorphisms'), STMS ('Sequence Tagged Microsatellite Sites') (Edward et al., 1991).

Quando um SSR é amplificado individualmente, utilizando pares de primers complementares, as seqüências únicas que o flanqueiam, quase sempre, apresentam extensivo polimorfismo para o tamanho de bandas. Este polimorfismo geralmente é resultado da ocorrência de diferentes números de unidades repetitivas dentro da estrutura do microssatélite. Segundo Levinson e Gutman (1987), essa variação no número de repetições pode ter se originado por crossing-over desigual ou erro da DNA polimerase durante a replicação ('slippage').

As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a seleção de primers específicos que amplificam, via PCR ('Polimerase Chain Reaction'), fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (Borém e Caixeta, 2006).

Independentemente da origem da variação e do elemento repetitivo, cada SSR constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo. Essa natureza altamente informativa combinada com a especificidade e rapidez da tecnologia do PCR faz desses marcadores uma eficiente ferramenta para estudos de genes eucarióticos (Borém e Caixeta, 2006).

A análise de marcadores microssatélites é considerada também uma poderosa ferramenta no estudo de mapeamento genômico, da genética de populações, do manejo e da conservação de espécies, além de sua grande aplicação em abordagens forenses como identificação individual e em exames de paternidade (Schusler et al., 1996).

A ocorrência de polimorfismos gerados por meio de marcadores microssatélites foi relatado, inicialmente, em soja, por Akkaya et al. (1992). Entre outras aplicações, os microssatélites têm sido utilizados na caracterização da diversidade genética, na identificação de germoplasma e no estudo da dinâmica de populações (Thomas e Scott, 1993; Yang et al., 1994; Rongwen et al., 1995; Smith et al., 1997; Senior et al., 1998). Em Soja, o alto nível de polimorfismo revelado pelos

marcadores microssatélites foi explorado por Glazko et al. (1999), na caracterização e separação entre variedades locais e genótipos selvagens, mediante a análise da diversidade genética. Diwan e Cregan (1997), em estudos sobre a diversidade gênica em soja mediante análise de 20 *loci* microssatélites, distinguiram cultivares norte-americanas modernas, que apresentavam características morfológicas idênticas, mas não conseguiram separar dois genótipos de soja.

Em estudos referentes a mapeamento de genes específicos, os marcadores SSR têm sido muito utilizados para determinar características agronomicamente importantes (Bonato, 2000). Os marcadores microssatélites têm potencial para assistir à seleção de genótipos nos programas de melhoramento e têm sido utilizados para diversas culturas, incluindo a soja (Concibido et al., 2004). Além disso, já foram utilizados no mapeamento de genes de resistência a doenças em soja, como por exemplo ao nematóide de cisto (Schuster et al., 2001), nematóide de galhas (Fuganti et al., 2004), mancha parda (Brogin, 2005) e ao fungo que causa ferrugem asiática (Silva, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Um total de 48 cultivares de soja (Quadro 1) foram plantadas e mantidas em casa de vegetação, localizada na Embrapa-Soja, Londrina, PR. As plantas, foram cultivadas em vasos com 20 cm de diâmetro e 25 cm de altura, contendo cerca de 4,5kg de uma mistura de solo, areia e esterco bovino. Para cada cultivar, foram utilizados 2 vasos com 8 plantas cada, distribuídos aleatoriamente na casa de vegetação. O experimento foi conduzido até o estágio de senescência para a colheita das vagens e sementes.

Quadro 1 – Cultivares de soja analisadas com os marcadores microssatélites

Amostra	Cultivar	Amostra	Cultivar
1	BRS Juliana RR	25	BRS GO 204 [Goiânia]
2	BRS Gisele RR	26	BRS Torena
3	BRS MG 850G RR	27	BRS GO Raissa
4	BRS255RR	28	MG/BR 46 (Conquista)
5	BRS256RR	29	BRS Gralha
6	BRS270RR	30	MS BR39 Chapadão
7	BRS Favorita	31	BRS GO Jataí
8	BRS 243 RR	32	BRS Simbaíba
9	BRS246RR	33	BRS Barreiras
10	BRS Charruá RR	34	BRS Raimunda
11	BRS Tracajá	35	BRS GO Chapadões
12	BRS Macota	36	BRS 263 [Diferente]
13	BRS GO Mineiros	37	BRSGO Araçu
14	BRS 213	38	BRSMG-810c
15	BRS Caiapônia	39	BRS Tianá
16	BRS257	40	BRSGO Graciosa
17	BRS133	41	M-soy-7501
18	Embrapa 48	42	CD-201
19	BRS Invernada	43	NK412113
20	BRS184	44	BRS258
21	BRS217 Flora	45	BRS282
22	BRS218 Nina	46	BRS284
23	BRS Jiripoca	47	BMX-Magna
24	BRS GO Luziânia	48	Willians

3.2. Avaliação de características fenotípicas

Para garantir a pureza das cultivares utilizadas no desenvolvimento deste trabalho, após o plantio das mesmas, e coleta do material vegetal para análise de DNA, as plantas foram mantidas em casa de vegetação e foram avaliadas para quatro características fenotípicas, de fácil análise e com características diferenciadoras claras: cor do hipocótilo, cor da flor, cor da pubescência, e cor do hilo.

3.3. Extração do DNA genômico

Para a extração de DNA, foram coletados, em estágio V3, um trifólio de cada um dos 16 indivíduos de cada cultivar, os quais foram imediatamente acondicionados em recipiente que continha nitrogênio líquido. Após a coleta, as amostras foram maceradas em método de *bulk*, sendo posteriormente armazenadas em tubos plásticos, identificadas e transferidas para o ultrafreezer a -80°C. O DNA de cada amostra foi extraído, em duplicata, de acordo com procedimento descrito por Keim et al. (1988), onde, aproximadamente, um grama de tecido foliar congelado foi pulverizado, utilizando-se almofariz, e então transferido para microtubos com capacidade para 1,5mL. Em cada microtubo foi adicionado tampão de extração na proporção de quatro vezes o volume da amostra [100mM tris, pH 8,0, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 1% (m/v) brometo de trimetil N-cetil amônio (CTAB), 0,1% (v/v) 2-mercaptoetanol]. A suspensão foi incubada em 65° C por 60 minutos, com agitação manual a cada 15 minutos.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 6.000 rpm por 10 minutos, com transferência da fase aquosa para outro microtubo. Foi adicionado igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), o qual foi misturado à solução por inversões e então 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, posteriormente, a solução foi centrifugada a 13.000rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e adicionando-se 0,5mL de etanol 70%. Uma nova centrifugação foi realizada e o sobrenadante foi descartado, para diluição do DNA, precipitando em 0,4mL de 10mM Tris/1mM EDTA,

pH 8,0. Para finalizar, foi adicionada a enzima RNase A na proporção de $40\mu\text{g.mL}^{-1}$, com incubação a 37°C por pelo menos 30 minutos.

Após a extração de DNA das folhas de soja, foi realizada a quantificação, determinada por análise espectrofotométrica utilizando o equipamento Nanodrop N-1000 Spectrophotometer. As amostras foram então diluídas para se obter uma concentração final de $10\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$.

Um sistema de prova e contraprova foi utilizado no processamento e análise das amostras. O DNA de cada cultivar foi aliquoteado para dois tubos plásticos de 1,5mL. A primeira amostra analisada foi utilizada para a prova e a segunda amostra foi utilizada para a contraprova. A prova foi processada independentemente da contraprova em dias diferentes para a confirmação do resultado.

3.4. Loci microssatélites

Foram selecionados 23 dos 36 *loci* microssatélites avaliados, (Quadro 2) para serem marcados com fluorescência e agrupados em multiplex para caracterização de cultivares de soja do Banco de Germoplasma da Embrapa Soja.

Os 23 pares de primers tiveram a fita senso marcada com fluorescência azul (FAM), verde (HEX), ou amarela (NED) para detecção no filtro virtual D em um sequenciador automático ABI3100 Genetic Analyzer, de acordo com a tecnologia amplamente utilizada para análise semi-automatizada para identificação individual (Fregeau e Fourney, 1993).

3.5. Eletroforese em géis de poliacrilamida

Os *loci* microssatélites analisados no sistema de genotipagem semi-automatizado foram selecionados com base no seu conteúdo informativo para discriminação genética individual, melhor robustez e repetibilidade nos procedimentos de análise e interpretação de dados. Para seleção destes, foi realizada uma triagem utilizando 36 *loci* microssatélites identificados com base na literatura (Song et al., 1999; Song et al., 2004; Wu et al., 2008), sendo utilizados para tanto 12 cultivares de soja dentre as 48 selecionadas para o trabalho. O perfil genotípico de cada *locus* foi avaliado em sistema tradicional, em géis de poli-

acrilamida a 10%.

Quadro 2 – *Loci* microssatélites selecionados para compor os sistema de genotipagem de cultivares de soja, seus respectivos grupos de ligação (GL), seqüências senso e anti-senso e fluorescências utilizadas para marcação

<i>Locus</i>	GL	Seqüência (5'-3')	Fluorescência ^{1/}	Referência ^{2/}
Satt042	A1	F-GACTTAATTGCTTGCTATGA R-GTGGTGACACTCACTT	HEX	Cregan et al. (1994)
Satt233	A2	F-AAGCATACTCGTCGTAAC R-GCGGTGCAAAGATATTAGAAA	NED	Cregan et al. (1999)
Satt070	B2	F-TAAAAATTTAAAATACTAGAAGACAAC R-TGGCATTAGAAAATGATATG	NED	Song et al. (2004)
Sat_085	C1	F-GGTTTTAGATCCTTAAATTTGT R-GGGGAAGCAAGTAGCT	FAM	Song et al. (2004)
Satt100	C2	F-ACCTCATTTTGGCATAAA R-TTGGAAAACAAGTAATAATAACA	NED	Song et al. (2004)
Satt079	C2	F-AGTCGAAGATACACAATTAGAT R-CTTTTAGACACAAATTTATCACT	FAM	Cregan et al. (1994)
Satt005	D1b	F-TATCCTAGAGAAGAATAAAAAA R-GTCGATTAGGCTTGAAATA	FAM	Song et al. (2004)
Satt002	D2	F-TGTGGGTAAAATAGATAAAAAAT R-TCATTTTGAATCGTTGAA	NED	Song et al. (2004)
Satt045	E	F-TGGTTTCTACTTTCTATAATTATTT R-ATGCCTCTCCCTCCT	HEX	Song et al. (2004)
Satt114	F	F-GGGTTATCCTCCCAATA R-ATATGGGATGATAAGGTGAAA	NED	Song et al. (2004)
Satt586	F	F-GCGGCCTCCAACTCCAAGTAT R-GCGCCCAAATGATTAATCACTCA	HEX	Wu et al. (2008)
Satt288	G	F-GCGGGGTGATTTAGTGTTGACACCT R-GCGCTTATAATTAAGAGCAAAAAG	NED	Song et al. (2004)
Sat_064	G	F-TAGCTTTATAATGAGTGTGATAGAT R-GTATGCAAGGGATTAATTAAG	HEX	Song et al. (2004)
Sct_187	G	F-CATGCTCCCATTCTCT R-AACATTGGCTTTTTACTTAG	HEX	Song et al. (2004)
Satt612	G	F-GTCATACTGGGTGTTTCATTTATGAC R-GCGCCTTTTAGTCTCTGAAAGTATTT	HEX	Song et al. (2004)
Satt181	H	F-TGGCTAGCAGATTGACA R-GGAGCATAGCTGTTAGGA	NED	Song et al. (2004)
Sct_001	J	F-TTAAGTTTCCCTCTCTCTCT R-CTTGTTCCCTTCGCTCAC	FAM	Song et al. (2004)
Satt431	J	F-GCGTGGCACCCCTTGATAAATAA R-GCGCACGAAAGTTTTCTGTAAACA	HEX	Song et al. (2004)
Satt046	K	F-AAAATAACTAAAATGTCTTCTCA R-TTGGTCAGATTATTATAAGATTG	FAM	Wu et al. (2008)
Satt540	M	F-CTGGCGAATCAAGCTTTGTAAC R-CCGTGATTGCGAAGAGGATATT	NED	Song et al. (2004)
Satt009	N1	F-CCAACCTGAAATTAAGAGAAA R-CTTACTAGCGTATTAACCCTT	FAM	Song et al. (2004)
GMABA B	N1	F-CAAAACATAAAAAAGGTGAGA R-AAGAACCACACTAATATTATT	HEX	Song et al. (2004)
Sat_038	O	F-GCGTCGCAACTTTTTCTTTCTTACT R-CGAGTTCTTTAACAACACTCACTTTT	FAM	Song et al. (2004)

^{1/}FAM = Fluorescência azul; HEX = Fluorescência verde; NED = Fluorescência amarela.

3.6. Montagem do sistema de análise e reação de polimerase em cadeia (PCR)

A montagem completa do sistema de genotipagem consistiu na utilização de três placas de PCR fundo cônico com 96 poços, permitindo uma análise conjunta dos 24 *loci* microssatélites em 12 amostras. Cada uma das placas continha oito *loci* diferentes, dispostos nas linhas das placas numeradas de A a H. A disposição dos *loci* nas linhas respeitou a combinação das três marcações fluorescentes diferentes utilizadas, formando assim os triplexes. As amostras foram dispostas nas colunas das placas (numeradas de 1 a 12), obedecendo-se a mesma ordem nas três placas.

A amplificação dos *loci* microssatélites utilizou a metodologia descrita por Akkaya et al. (1995), com modificações. As reações de PCR foram compostas por 10mM Tris, pH 8,5, 50mM KCl, 1,5mM Mg²⁺, 130μM de dNTPs, 0,2μM de cada primer (Research Genetics, Inc.), 10ng de DNA genômico e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, em um volume final de 10μL.

As condições de amplificação consistiram de um período inicial de desnaturação do DNA de cinco minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos térmicos, com cada um deles incluindo as etapas de desnaturação do DNA por um minuto a 94°C, anelamento dos pares de primers por um minuto a 55°C e extensão por um minuto a 72°C. Após os ciclos térmicos, um período final de extensão de trinta minutos a 72°C foi realizado.

Os oito sistemas triplex foram montados combinando 5,0μL dos produtos da reação dos *loci* marcados com FAM, 5,0μL dos *loci* marcados com NED, e 5,0μL dos *loci* marcados com HEX, em um volume final de 15μL, formando assim o tríplex de análise. Após essa montagem, o sistema recebeu o nome de placa multiplex permitindo assim a análise simultânea de vários *loci* microssatélites. A montagem do sistema de corrida consistiu na retirada de 1,5μL de amostra da placa multiplex e posterior transferência de cada uma das amostras para outra placa de 96 poços mediante a utilização de uma pipeta multicanal. Após isso, adicionou-se 9μL do mix ROX em cada uma das 96 amostras. O mix ROX é composto por formamida e padrão interno de definição de tamanho de fragmentos (Gene Scan™ 500 ROX™ Size Standard - Applied Biosystems), na proporção de 9:1, respectivamente. Em seguida, as amostras foram desnaturadas a uma temperatura de 95°C por cinco minutos com o objetivo de separar a dupla hélice em fitas simples e, imediatamente após o término, a placa foi resfriada em gelo, para impedir o re-anelamento do DNA e inserida no sequenciador automático ABI PRISM Genetic Analyser® 3100 (Applied

Biosystem, Foster City, CA).

3.7. Determinação dos *loci* microssatélites

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em capilar utilizando polímero de alta resolução, em seqüenciador automático. As análises para estimar os tamanhos dos fragmentos dos alelos foram realizadas utilizando os programas GeneScan® Analyses software versão 2.1.1 (ABPEC, Foster City, CA) e Genotyper® software, versão 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). A determinação acurada do tamanho dos fragmentos que corresponderam aos alelos nos *loci* analisados foi realizada de acordo com procedimentos descritos por Diwan e Cregan (1997) e Song et al. (1999).

3.8. Interpretação genética

Um dos fatores determinantes para a escolha dos primers foi o número de alelos por *locus*, pois quanto maior o número de alelos detectados, maior a probabilidade de se encontrar alelos polimórficos e alelos raros. Os alelos foram visualizados como picos após a eletroforese em gel de alta resolução e identificados em pares de bases pela comparação automatizada com o padrão de fragmentos de DNA Gene Scan™ 500 ROX™ Size Standard, com precisão de uma casa decimal.

Devido à elevada precisão, elaborou-se uma metodologia onde os alelos que apresentassem uma base de diferença entre eles seriam anexados e tabulados como sendo um único alelo. Estabeleceu-se que o número máximo de alelos agrupados seria três.

Por ser a soja uma espécie autógama, o genótipo observado em cada *locus* em linhagens avançadas é tipicamente homozigoto, ou seja, deve-se observar apenas um pico representativo de ambos os alelos presentes no *locus*. Ocasionalmente podem ser observados dois alelos em um *locus*, o que seria evidência de heterozigosidade residual em caso de semente individual ou mistura de linhas em caso de amostras de bulks de sementes.

Os dados genotípicos foram utilizados para a estimativa do número de alelos e das freqüências dos alelos observados neste conjunto de amostras do material

depositado no Banco da Embrapa - Soja.

Sendo a soja uma espécie autógama, partiu-se da premissa de que o coeficiente de endocruzamento é $F=1$ e, portanto, a frequência de ocorrência de um genótipo homozigoto (p^2) é igual à própria frequência alélica p .

Weir (1990) sugeriu o termo diversidade gênica para descrever o valor relativo de uma sonda de RFLP com respeito à quantidade de polimorfismo que é detectada em um grupo de indivíduos homozigotos de uma espécie autógama. A mesma expressão se aplica para primers de microssatélites. Os dados de frequências alélicas foram utilizados para estimar a Diversidade Gênica de cada *locus*, o que representa um indicador do poder de discriminação genética do *locus* em testes de identidade sendo o parâmetro adequado para a avaliação de diversidade em plantas autógamas.

A estimativa de Diversidade Gênica varia entre 0 e 1 e quanto mais próximo de 1, mais informativo é o *locus*. Esta análise permite identificar os marcadores geneticamente mais informativos para testes de identidade genética.

O valor da diversidade genética do *locus* é muito similar à heterozigosidade que é comumente utilizada para descrever a informatividade de um marcador molecular em espécies alógamas. Anderson et al. (1993) indicaram que a diversidade genética do *locus* é essencialmente a mesma da informação do conteúdo de polimorfismo (PIC – Conteúdo de Informação do Polimorfismo) como utilizado por Botstein et al. (1980). O valor de PIC é de fundamental importância para determinação do nível polimorfismo dentro de uma população. Esse valor depende do número de alelos detectáveis, bem como da distribuição de sua frequência. Desta forma, quanto maior o valor de PIC maior será a informação polimórfica obtida.

Keim et al. (1992) referem-se à diversidade genética do *locus* como um índice de polimorfismo. Neste trabalho, o termo foi traduzido para diversidade genética do *locus*, que é definida como diversidade genética do *locus* = $1 - \sum_{i=1}^n P_{ij}^2$, onde P_{ij} é a frequência do alelo j para o *primer* ou loco i .

3.9. Certificação das cultivares

Letras foram atribuídas codificando cada um dos *loci* microssatélites e o tamanho dos seus respectivos alelos, em pares de base (pb), foram subscritos ao

lado das letras (Quadro 3).

Quadro 3 – Identificação dos *loci* microssatélites, respectivas letras atribuídas a cada um deles e suas identificações moleculares

<i>Locus</i>	Letra	<i>Locus</i>	Letra
Sat_038	A	Sat_064	M
Satt005	B	Satt612	N
Satt009	C	Sct_187	O
Sat_085	D	Satt114	P
Satt046	E	Satt002	Q
Satt079	F	Satt540	R
Sct001	G	Satt100	S
Satt045	H	Satt233	T
GMABAB	I	Satt181	U
Satt042	J	Satt070	V
Satt431	K	Satt288	X
Satt586	L		

Cada cultivar foi então identificada por letras gerando assim uma etiqueta genética com a respectiva fórmula genotípica, ou seja, se os *loci* A, B, C, D, F e G e seus respectivos alelos 123, 145, 134, 158, 232 e 254 distinguem determinada cultivar, a fórmula genotípica da mesma será $A_{123}B_{145}C_{134}D_{158}F_{232}G_{254}$. Essa, portanto, será a etiqueta genética da cultivar em questão.

4. RESULTADOS E DISCUSSAO

4.1. Características fenotípicas

Para garantir a pureza dos materiais genéticos utilizados neste trabalho, pelo menos 16 indivíduos de cada cultivar genotipada foram também caracterizados fenotipicamente para quatro características que são de fácil acesso e diferenciadoras claras, quais sejam: cor do hipocótilo, cor da flor, cor da pubescência e cor do hilo (Quadro 4).

A heterogeneidade genética entre as cultivares é muito importante para as análises de distinguibilidade. No entanto, caso esta variabilidade seja fruto da contaminação dos materiais com sementes oriundas de outros genótipos, a interpretação e seleção dos *loci* diferenciadores fica comprometida.

Os dados apresentados em casa de vegetação foram comparados e mostraram-se idênticos aos apresentados pelo sistema de identificação de cultivares presente no BAG da Embrapa – Soja, não ocorrendo nenhuma diferença entre eles, evidenciando que não houve mistura de sementes ou contaminação do material analisado.

Quadro 4 - Características fenotípicas obtidas mediante análise das 48 cultivares de soja

Amostra	Cultivar	Cor do hipocótilo	Cor da flor	Cor da pubescência	Cor do hilo
1	BRS Juliana RR	Roxa	Roxa	Marrom	Preto
2	BRS Gisele RR	Roxa	Roxa	Marrom	Preto
3	BRS MG 850G RR	Roxa	Roxa	Marrom	Preto
4	BRS255RR	Verde	Branca	Marrom	Preto
5	BRS256RR	Verde	Branca	Cinza	Marrom Claro
6	BRS270RR	Roxa	Roxa	Cinza	Marrom Claro
7	BRS Favorita	Roxa	Roxa	Marrom	Preto
8	BRS 243 RR	Verde	Branca	Marrom	Marrom
9	BRS246RR	Verde	Branca	Marrom	Marrom
10	BRS Charruá RR	Verde	Branca	Marrom	Marrom
11	BRS Tracajá	Roxa	Roxa	Cinza	Preto
12	BRS Macota	Roxa	Roxa	Cinza	Preto Imperfeito

Quadro 4, Cont...

13	BRS GO Mineiros	Roxa	Roxa	Marrom	Marrom
14	BRS213	Verde	Branca	Cinza	Amarela
15	BRS Caiapônia	Roxa	Roxa	Marrom	Preto
16	BRS257	Verde	Branca	Cinza	Marrom Claro
17	BRS133	Verde	Branca	Marrom	Marrom
18	Embrapa 48	Verde	Branca	Cinza	Marrom Claro
19	BRS Invernada	Verde	Branca	Marrom	Preto
20	BRS184	Roxa	Roxa	Marrom	Preto
21	BRS217 [Flora]	Roxa	Roxa	Marrom	Preto
22	BRS218 [Nina]	Roxa	Roxa	Cinza	Marrom Claro
23	BRS Jiripoca	Verde	Branca	Cinza	Marro Claro
24	BRSGO Luziânia	Roxa	Roxa	Marrom	Marrom
25	BRSGO 204 [Goiânia]	Roxa	Roxa	Marrom	Marrom
26	BRS Torená	Roxa	Roxa	Cinza	Marrom Claro
27	BRSGO Raissa	Verde	Branca	Cinza	Marrom Claro
28	MG/BR 46 (Conquista)	Roxa	Roxa	Marrom	Preto
29	BRS Gralha	Verde	Branca	Marrom	Preto
30	MS/BR 39 (Chapadão)	Verde	Branca	Cinza	Marrom Claro
31	BRSGO Jataí	Verde	Branca	Marrom	Marrom
32	BRS Sambaíba	Verde	Branca	Marrom	Marrom
33	BRS Barreiras	Roxa	Roxa	Marrom Claro	Marrom
34	BRS Raimunda	Verde	Branca	Marrom	Preto
35	BRS GO Chapadoês	Verde	Branca	Marrom	Preto
36	BRS 263 [Diferente]	Roxa	Roxa	Marrom	Preto
37	BRSGO Araçu	Verde	Branca	Marrom	Preto
38	BRSMG-810C	Verde	Branca	Marrom	Preto
39	BRS Tianá	Roxa	Roxa	Cinza	Marrom Claro
40	BRSGO Graciosa	Roxa	Roxa	Marrom	Marrom
41	M-SOY 7501	Roxa	Roxa	Marrom	Marrom
42	CD 201	Verde	Branca	Cinza	Marrom Claro
43	NK-412113 (V MAX)	Verde	Branca	Cinza	Marrom Claro
44	BRS 258	Verde	Branca	Cinza	Marrom Claro
45	BRS282	Verde	Branca	Cinza	Marrom Claro
46	BRS284	Roxa	Roxa	Cinza	Marrom Claro
47	BMX-Magna	Verde	Branca	Cinza	Marrom Claro
48	Willians	Verde	Branca	Marrom	Preto

4.2. Seleção dos *loci* microssatélites

A determinação dos *loci* utilizados neste estudo foi realizada mediante uma triagem analisando todos os 36 *loci* microssatélites pré-selecionados. Destes, 23 foram selecionados mediante análise em géis de poli-acrilamida (Figura 1), por

apresentarem perfil eletroforético polimórfico no grupo de cultivares avaliadas, característica essa essencial para a discriminação genética individual, e repetibilidade nos procedimentos de análise e interpretação de dados.

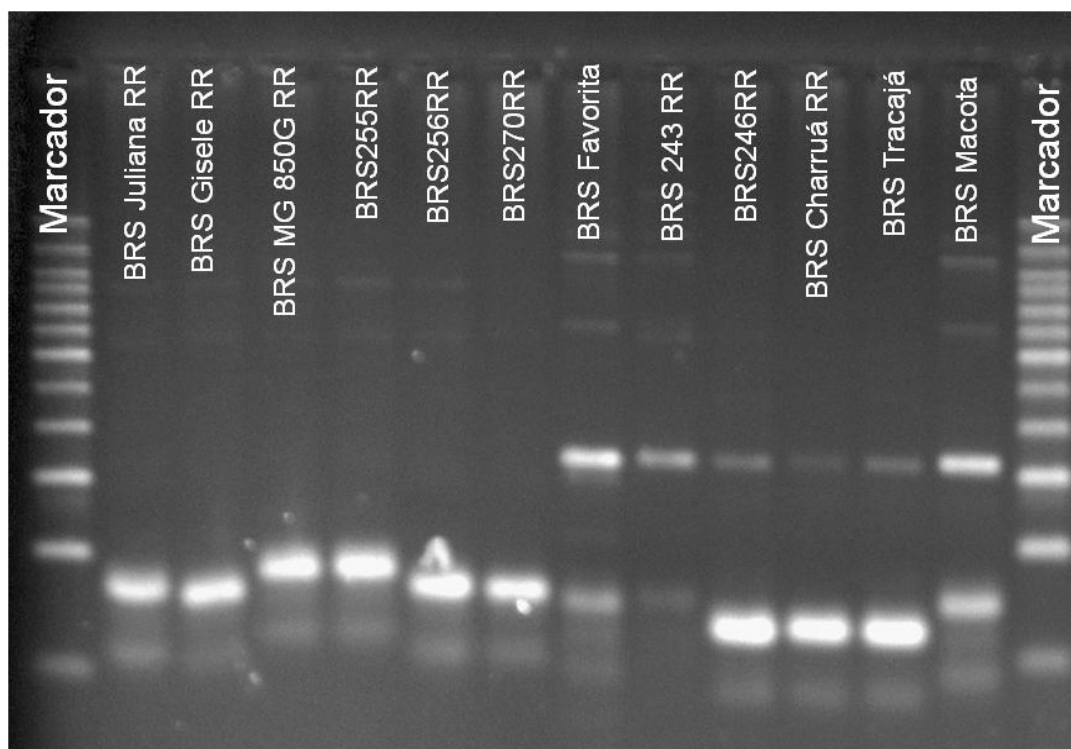


Figura 1 – Perfil eletroforético do *loci* microssatélite Satt038, selecionado em conjunto com 22 outros *loci* para compor o sistema de genotipagem das cultivares de soja, avaliado em 12 cultivares de soja.

4.3. Interpretação dos dados genotípicos

O sistema de genotipagem composto de 23 pares de primers microssatélites marcados com fluorescência foi utilizado para a identificação genética das 48 cultivares de soja, utilizando seqüenciador automático.

Os 23 *loci* analisados bem como o número de alelos observados estão apresentas na Figura 2. No total, foram identificados 201 alelos nas 48 cultivares de soja analisadas, com uma média de 8,73 alelos por *locus*.

Devido à elevada precisão do sistema, o número de alelos observados foi relativamente alto. Contudo, muitos deles diferiram em apenas uma única base. As amostras contraprova serviram para validar o tamanho dos alelos obtidos (Apêndice - Quadros 1A, 2A e 3A). Os *loci* que apresentaram o menor número de alelos foram

Satt042, Satt045, Satt233 e Satt002, os quais evidenciaram seis alelos, e os *loci* mais polimórficos foram Sat_038 e Satt009, com 12 alelos cada.

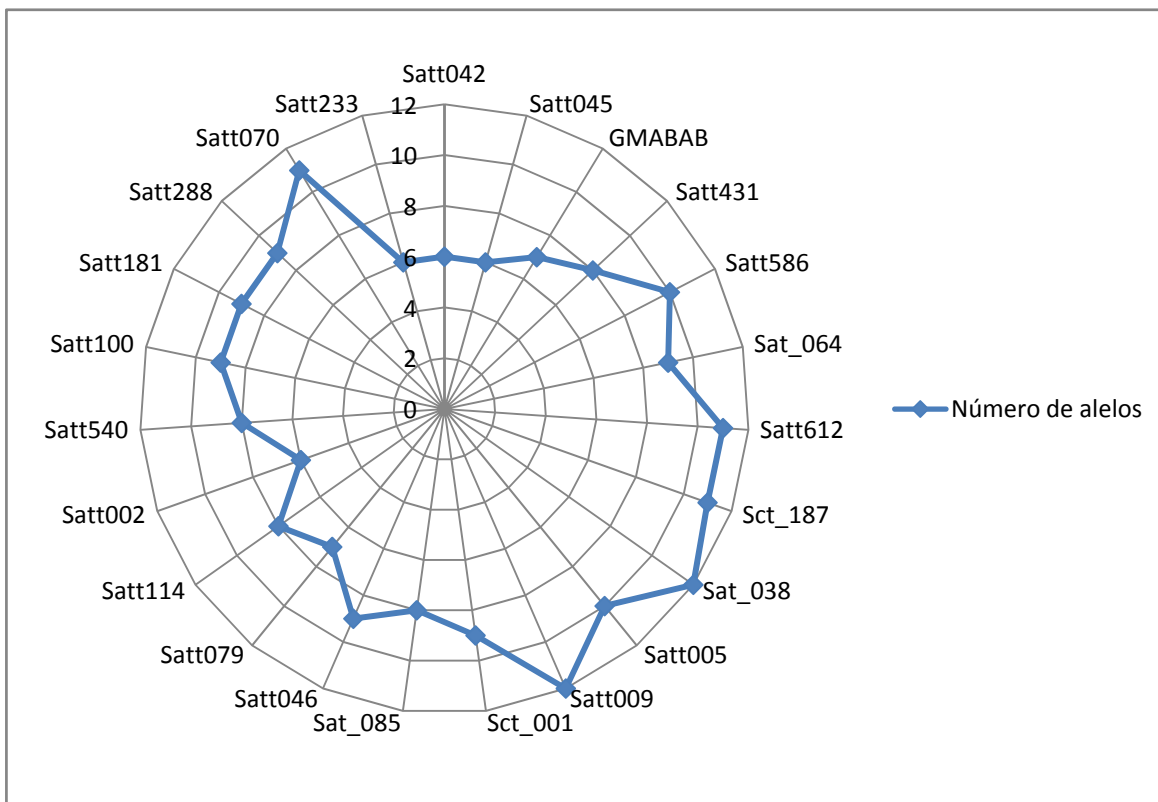


Figura 2 – Número de alelos observados nos 23 *loci* microsatélites analisados nas 48 cultivares de soja.

4.4. Análises de distinguibilidade

Os valores de diversidade genética encontrados foram muito satisfatórios, uma vez que as cultivares utilizadas são variedades elites do germoplasma brasileiro e, portanto, geneticamente muito próximas entre si. Os valores obtidos se devem à eficiência da técnica utilizada a qual permitiu a identificação precisa e pontual de um grande número de alelos, alguns divergindo em poucas bases.

A frequência genética variou de 0,021 a 0,65, sendo que 41,8% da frequência apresentada entre as 48 cultivares foi de alelos raros; 23,07% de alelos identificados em três a quatro cultivares; 15,38% em alelos observados em cinco a nove cultivares; 10,57% em 10 a 14 cultivares; 4,8% em 15 a 19 cultivares; 2,4% para 22 cultivares; 1,44% para 26 cultivares e 0,9% para alelos identificados em 29 cultivares.

Os valores da diversidade genética associados a cada *locus* microssatélite variaram de 0,54 a 0,85 (Quadro 5), com média total de 0,75 entre todos os *loci* analisados.

Quadro 5 – *Loci* analisados, suas respectivas marcações fluorescentes, número de alelos observados e os valores de diversidade genética obtidos mediante análise das 48 cultivares de soja

<i>Locus</i>	Marcação ^{1/}	Número de alelos	Diversidade genética
Satt042	HEX	6	0,72
Satt045	HEX	6	0,62
GMABAB	HEX	7	0,67
Satt431	HEX	8	0,82
Satt586	HEX	10	0,85
Sat_064	HEX	9	0,75
Satt612	HEX	11	0,83
Sct_187	HEX	11	0,76
Sat_038	FAM	12	0,85
Satt005	FAM	10	0,84
Satt009	FAM	12	0,85
Sct_001	FAM	9	0,80
Sat_085	FAM	8	0,77
Satt046	FAM	9	0,55
Satt079	FAM	7	0,72
Satt114	NED	8	0,76
Satt002	NED	6	0,73
Satt540	NED	8	0,82
Satt100	NED	9	0,66
Satt181	NED	9	0,78
Satt288	NED	9	0,65
Satt070	NED	11	0,75
Satt233	NED	6	0,73
Total	-	201	-
Média	-	8,73	0,75

^{1/}FAM = Fluorescência azul; HEX = Fluorescência verde; NED = Fluorescência amarela.

Os valores de diversidade genética obtidos foram relativamente elevados sendo superiores a 0,5, indicando que os *loci* analisados foram suficientes para distinguir as cultivares analisadas apresentando alta divergência entre as mesmas.

Rongwen et al. (1995), analisando sete *loci* microssatélites para caracterizar 96 genótipos de soja, observaram valores de diversidade genética extremamente

elevados, variando de 0,71 a 0,95. Segundo Alcântara-Neto (2001), os valores elevados observados pelos autores podem ser explicados pela utilização de germoplasma constituído por introduções de plantas e por genótipos de *Glycine soja* e *Glycine max*, o que garantiu elevada variabilidade entre os materiais.

Os valores de diversidade genética obtidos neste trabalho não foram utilizados para determinar os *loci* que poderiam distinguir e identificar as cultivares, pois ao analisar os maiores índices de diversidade seria necessário um número maior de *loci*.

O número de *loci* necessários para a distinção das cultivares foi obtido mediante a comparação entre os mesmos. Foi montada uma matriz computacional que possibilitasse distinguir as cultivares de acordo com o tamanho de seus alelos e por meio dessa comparação, atribuir o menor número possível de *loci* para diferenciar os genótipos analisados. Com base na informação gerada por estes dados, foi possível identificar seis *loci*, dos quais cinco distinguiram 99,82% das cultivares e a adição de mais um *loci* solucionou o 0,18% de conflito que existia. A comparação dos genótipos realizada por meio do tamanho de seus alelos gerou uma matriz de leitura, identificando o *loci* utilizado para a distinção de cada uma das cultivares (Quadro 6).

Os *loci* que atenderam à premissa definida de que a distinção entre as cultivares selecionadas deveria ser realizada pelo menor número de *loci* possível foram o Sat_038, Satt612, Satt181, Satt540, Satt009 e Satt005 os quais apresentaram, respectivamente 12, 11, 9, 8, 12 e 10 alelos e foram denominados de *loci* diferenciadores. O *locus* Sat_038 contribuiu com 78,72% da distinguibilidade total requerida nesta análise, seguido pelo *locus* Satt612 com 16,84%, os *loci* Satt540 com 2,39%, Satt181 com 1,68%, Satt009 com 0,44%, e o *locus* Satt005 foi utilizado para distinguir um único conflito criado entre as cultivares BRS Favorita e BRS184.

Com base nessa informação, pode-se concluir que um número relativamente pequeno de *loci* foi necessário para distinguir e identificar as 48 cultivares analisadas, em função da alta diversidade genética apresentada pelos *loci* analisados e também pelo alto número de alelos encontrados entre essas cultivares.

No Quadro 7, estão apresentados os *loci* diferenciadores identificados nas 48 cultivares de soja e que serão utilizados para compor as etiquetas genéticas.

Quadro 7 – Loci diferenciadores identificados nas 48 cultivares de soja analisadas

Amostra	Cultivar	Loci diferenciadores					
		Sat_038	Satt005	Satt009	Satt612	Satt540	Satt181
1	BRS Juliana RR	A ₂₄₄	B ₁₇₉	C ₁₉₉	O ₁₈₉	S ₁₄₄	V ₂₀₄
2	BRS Gisele RR	A ₂₄₄	B ₁₅₄	C ₂₁₄	O ₁₈₉	S ₁₆₄	V ₂₀₀
3	BRS MG 850G RR	A ₂₀₀	B ₁₇₉	C ₂₂₀	O ₁₇₄	S ₁₆₄	V ₂₀₄
4	BRS255RR	A ₂₄₄	B ₁₅₇	C ₂₁₄	O ₁₈₉	S ₁₄₄	V ₁₅₈
5	BRS256RR	A ₂₀₀	B ₁₅₄	C ₂₁₄	O ₁₈₉	S ₁₄₄	V ₁₇₄
6	BRS270RR	A ₂₀₀	B ₁₅₇	C ₂₂₃	O ₁₈₉	S ₁₄₄	V ₂₀₄
7	BRS Favorita	A ₂₄₀	B ₁₇₉	C ₂₁₄	O ₁₈₉	S ₁₆₄	V ₂₀₄
8	BRS 243 RR	A ₂₄₀	B ₁₄₄	C ₁₉₉	O ₁₆₆	S ₁₄₉	V ₁₇₄
9	BRS246RR	A ₂₄₀	B ₁₄₄	C ₂₁₇	O ₁₈₅	S ₁₄₉	V ₂₁₃
10	BRS Charruá RR	A ₂₄₄	B ₁₅₄	C ₁₅₈	O ₁₉₈	S ₁₆₄	V ₁₉₅
11	BRS Tracajá	A ₂₄₄	B ₁₅₇	C ₁₈₂	O ₁₇₄	S ₁₄₉	V ₁₇₄
12	BRS Macota	A ₂₄₀	B ₁₃₈	C ₂₁₄	O ₁₇₄	S ₁₄₉	V ₂₀₄
13	BRS GO Mineiros	A ₁₆₀	B ₁₄₁	C ₂₁₄	O ₁₈₉	S ₁₄₉	V ₂₀₄
14	BRS213	A ₂₀₀	B ₁₇₅	C ₂₁₄	O ₁₈₉	S ₁₄₁	V ₁₇₄
15	BRS Caiapônia	A ₁₄₉	B ₁₃₁	C ₂₁₄	O ₁₈₉	S ₁₆₀	V ₂₀₄
16	BRS257	A ₂₀₀	B ₁₄₁	C ₁₇₉	O ₁₈₉	S ₁₆₀	V ₁₇₄
17	BRS133	A ₂₄₀	B ₁₃₁	C ₂₁₄	O ₁₈₉	S ₁₄₉	V ₂₀₄
18	Embrapa 48	A ₂₄₀	B ₁₇₂	C ₁₈₂	O ₁₈₉	S ₁₆₀	V ₂₀₄
19	BRS Invernada	A ₁₆₀	B ₁₇₂	C ₂₀₄	O ₁₈₉	S ₁₆₄	V ₂₀₄
20	BRS184	A ₂₄₀	B ₁₇₂	C ₂₁₄	O ₁₈₉	S ₁₆₄	V ₂₀₄
21	BRS217 [Flora]	A ₂₄₄	B ₁₄₄	C ₂₂₀	O ₁₂₂	S ₁₆₄	V ₂₀₀
22	BRS218 [Nina]	A ₂₄₈	B ₁₅₄	C ₁₉₉	O ₁₈₅	S ₁₄₉	V ₁₉₅
23	BRS Jiripoca	A ₂₄₈	B ₁₅₇	C ₂₁₇	O ₁₄₆	S ₁₆₄	V ₂₀₄
24	BRS GO Luziania	A ₂₄₄	B ₁₄₄	C ₁₅₀	O ₁₄₀	S ₁₄₉	V ₂₀₄
25	BRS GO 204 Goiânia	A ₂₄₄	B ₁₄₁	C ₂₁₄	O ₁₆₆	S ₁₆₀	V ₂₀₄
26	BRS Torena	A ₂₄₄	B ₁₅₇	C ₂₁₇	O ₁₄₀	-	V ₁₇₄
27	BRS GO Raissa	A ₁₂₉	B ₁₅₇	C ₁₆₇	O ₁₄₆	S ₁₀₀	V ₁₉₅
28	MG/BR 46 (Conquista)	A ₂₄₀	B ₁₄₁	C ₂₁₄	O ₁₄₀	S ₁₄₉	V ₂₀₄
29	BRS Gralha	A ₁₃₅	B ₁₅₇	C ₁₅₈	O ₁₉₈	S ₁₀₀	V ₁₇₄
30	MS/BR39 (Chapadão)	A ₂₄₄	B ₁₅₇	C ₁₇₉	O ₁₈₉	S ₁₀₀	V ₁₇₄
31	BRS GO Jatai	A ₁₃₅	B ₁₅₇	C ₁₅₀	O ₁₇₄	S ₁₀₀	V ₁₇₄
32	BRS Sambaiba	A ₂₃₂	B ₁₃₈	C ₁₇₂	O ₁₃₀	S ₁₇₃	V ₁₅₈
33	BRS Barreiras	A ₂₃₂	B ₁₃₈	C ₁₇₂	O ₁₃₅	S ₁₆₀	V ₁₆₇
34	BRS Raimunda	A ₂₃₂	B ₁₃₈	C ₁₇₂	O ₁₃₅	S ₁₇₃	V ₁₆₄
35	BRS GO Chapadoes	A ₂₄₀	B ₁₃₈	C ₁₇₂	-	S ₁₇₃	-
36	BRS 263 [Diferente]	A ₂₃₂	B ₁₃₈	C ₁₇₂	O ₁₃₀	S ₁₇₃	V ₁₅₁
37	BRSGO Aracu	A ₂₃₂	B ₁₃₈	C ₁₇₂	O ₁₃₀	S ₁₆₀	V ₂₀₄
38	BRSMG-810c	A ₂₃₂	B ₁₃₈	C ₁₇₂	O ₁₃₀	S ₁₆₀	V ₁₆₄
39	BRS Tianá	A ₂₂₆	B ₁₃₈	C ₁₇₂	O ₁₄₆	S ₁₄₉	V ₁₅₈
40	BRSGO-Graciosa	A ₂₃₂	B ₁₄₁	C ₂₂₃	O ₁₄₆	S ₁₇₃	V ₁₅₁
41	M-soy-7501	A ₂₃₂	B ₁₃₈	C ₁₇₂	O ₁₄₀	S ₁₆₄	V ₁₆₇
42	CD 201	A ₂₀₀	B ₁₃₈	C ₁₇₂	O ₁₃₅	S ₁₆₀	V ₁₆₇
43	NK412113	A ₂₄₀	B ₁₃₈	C ₁₇₂	O ₁₄₆	S ₁₆₀	V ₁₅₁

Quadro 7, Cont.

44	BRS258	A ₂₃₇	B ₁₄₁	C ₁₆₇	O ₁₄₆	S ₁₆₄	V ₁₇₄
45	BRS282	A ₂₄₄	B ₁₅₇	C ₂₁₄	O ₁₄₆	S ₁₄₄	V ₂₀₄
46	BRS284	-	B ₁₆₇	C ₁₇₉	O ₁₄₀	-	V ₁₇₄
47	BMX-Magna	-	B ₁₅₇	C ₁₇₉	O ₁₄₆	-	V ₂₀₄
48	Willians	A ₁₁₇	B ₁₄₁	C ₁₅₈	O ₂₄₁	S ₉₅	V ₂₁₃

*(-) Dados perdidos.

4.5. Etiqueta genética

As etiquetas genéticas foram elaboradas por meio de comparações entre os seis *loci* que, neste estudo, receberam o título de *loci* diferenciadores (Quadro 8). Por meio dessas etiquetas, as cultivares receberam uma identificação molecular, ou seja, a fórmula genética contendo a informação de seus *loci* diferenciadores com o peso molecular dos respectivos alelos. Como consequência, essas etiquetas genéticas poderão ser utilizadas para fins de proteção como também em análise de pureza genética em lotes de sementes, permitindo assim diferenciar claramente as cultivares de soja.

Quadro 8 – Etiquetas genéticas elaboradas com base nas análises das 48 cultivares de soja com os seis *loci* diferenciadores

Cultivar	Etiqueta genética
BRS Juliana RR	A ₂₄₄ B ₁₇₉ C ₁₉₉ O ₁₈₉ S ₁₄₄ V ₂₀₄
BRS Gisele RR	A ₂₄₄ B ₁₅₄ C ₂₁₄ O ₁₈₉ S ₁₆₄ V ₂₀₀
BRS MG 850G RR	A ₂₀₀ B ₁₇₉ C ₂₂₀ O ₁₇₄ S ₁₆₄ V ₂₀₄
BRS255RR	A ₂₄₄ B ₁₅₇ C ₂₁₄ O ₁₈₉ S ₁₄₄ V ₁₅₈
BRS256RR	A ₂₀₀ B ₁₅₄ C ₂₁₄ O ₁₈₉ S ₁₄₄ V ₁₇₄
BRS270RR	A ₂₀₀ B ₁₅₇ C ₂₂₃ O ₁₈₉ S ₁₄₄ V ₂₀₄
BRS Favorita	A ₂₄₀ B ₁₇₉ C ₂₁₄ O ₁₈₉ S ₁₆₄ V ₂₀₄
BRS 243 RR	A ₂₄₀ B ₁₄₄ C ₁₉₉ O ₁₆₆ S ₁₄₉ V ₁₇₄
BRS246RR	A ₂₄₀ B ₁₄₄ C ₂₁₇ O ₁₈₅ S ₁₄₉ V ₂₁₃
BRS Charruá RR	A ₂₄₄ B ₁₅₄ C ₁₅₈ O ₁₉₈ S ₁₆₄ V ₁₉₅
BRS Tracajá	A ₂₄₄ B ₁₅₇ C ₁₈₂ O ₁₇₄ S ₁₄₉ V ₁₇₄
BRS Macota	A ₂₄₀ B ₁₃₈ C ₂₁₄ O ₁₇₄ S ₁₄₉ V ₂₀₄
BRS GO Mineiros	A ₁₆₀ B ₁₄₁ C ₂₁₄ O ₁₈₉ S ₁₄₉ V ₂₀₄
BRS213	A ₂₀₀ B ₁₇₅ C ₂₁₄ O ₁₈₉ S ₁₄₁ V ₁₇₄

Quadro 8, Cont.

BRS Caiapônia	A ₁₄₉ B ₁₃₁ C ₂₁₄ O ₁₈₉ S ₁₆₀ V ₂₀₄
BRS257	A ₂₀₀ B ₁₄₁ C ₁₇₉ O ₁₈₉ S ₁₆₀ V ₁₇₄
BRS133	A ₂₄₀ B ₁₃₁ C ₂₁₄ O ₁₈₉ S ₁₄₉ V ₂₀₄
Embrapa 48	A ₂₄₀ B ₁₇₂ C ₁₈₂ O ₁₈₉ S ₁₆₀ V ₂₀₄
BRS Invernada	A ₁₆₀ B ₁₇₂ C ₂₀₄ O ₁₈₉ S ₁₆₄ V ₂₀₄
BRS184	A ₂₄₀ B ₁₇₂ C ₂₁₄ O ₁₈₉ S ₁₆₄ V ₂₀₄
BRS217 [Flora]	A ₂₄₄ B ₁₄₄ C ₂₂₀ O ₁₂₂ S ₁₆₄ V ₂₀₀
BRS218 [Nina]	A ₂₄₈ B ₁₅₄ C ₁₉₉ O ₁₈₅ S ₁₄₉ V ₁₉₅
BRS Jiripoca	A ₂₄₈ B ₁₅₇ C ₂₁₇ O ₁₄₆ S ₁₆₄ V ₂₀₄
BRS GO Luziania	A ₂₄₄ B ₁₄₄ C ₁₅₀ O ₁₄₀ S ₁₄₉ V ₂₀₄
BRS GO 204 Goiânia	A ₂₄₄ B ₁₄₁ C ₂₁₄ O ₁₆₆ S ₁₆₀ V ₂₀₄
BRS Torena	A ₂₄₄ B ₁₅₇ C ₂₁₇ O ₁₄₀ V ₁₇₄
BRS GO Raissa	A ₁₂₉ B ₁₅₇ C ₁₆₇ O ₁₄₆ S ₁₀₀ V ₁₉₅
MG/BR 46 (Conquista)	A ₂₄₀ B ₁₄₁ C ₂₁₄ O ₁₄₀ S ₁₄₉ V ₂₀₄
BRS Gralha	A ₁₃₅ B ₁₅₇ C ₁₅₈ O ₁₉₈ S ₁₀₀ V ₁₇₄
MS/BR39 (Chapadão)	A ₂₄₄ B ₁₅₇ C ₁₇₉ O ₁₈₉ S ₁₀₀ V ₁₇₄
BRS GO Jatai	A ₁₃₅ B ₁₅₇ C ₁₅₀ O ₁₇₄ S ₁₀₀ V ₁₇₄
BRS Sambaiba	A ₂₃₂ B ₁₃₈ C ₁₇₂ O ₁₃₀ S ₁₇₃ V ₁₅₈
BRS Barreiras	A ₂₃₂ B ₁₃₈ C ₁₇₂ O ₁₃₅ S ₁₆₀ V ₁₆₇
BRS Raimunda	A ₂₃₂ B ₁₃₈ C ₁₇₂ O ₁₃₅ S ₁₇₃ V ₁₆₄
BRS GO Chapadoes	A ₂₄₀ B ₁₃₈ C ₁₇₂ S ₁₇₃
BRS 263 [Diferente]	A ₂₃₂ B ₁₃₈ C ₁₇₂ O ₁₃₀ S ₁₇₃ V ₁₅₁
BRSGO Aracu	A ₂₃₂ B ₁₃₈ C ₁₇₂ O ₁₃₀ S ₁₆₀ V ₂₀₄
BRSMG-810c	A ₂₃₂ B ₁₃₈ C ₁₇₂ O ₁₃₀ S ₁₆₀ V ₁₆₄
BRS Tianá	A ₂₂₆ B ₁₃₈ C ₁₇₂ O ₁₄₆ S ₁₄₉ V ₁₅₈
BRSGO-Graciosa	A ₂₃₂ B ₁₄₁ C ₂₂₃ O ₁₄₆ S ₁₇₃ V ₁₅₁
M-soy-7501	A ₂₃₂ B ₁₃₈ C ₁₇₂ O ₁₄₀ S ₁₆₄ V ₁₆₇
CD 201	A ₂₀₀ B ₁₃₈ C ₁₇₂ O ₁₃₅ S ₁₆₀ V ₁₆₇
NK412113	A ₂₄₀ B ₁₃₈ C ₁₇₂ O ₁₄₆ S ₁₆₀ V ₁₅₁
BRS258	A ₂₃₇ B ₁₄₁ C ₁₆₇ O ₁₄₆ S ₁₆₄ V ₁₇₄
BRS282	A ₂₄₄ B ₁₅₇ C ₂₁₄ O ₁₄₆ S ₁₄₄ V ₂₀₄
BRS284	B ₁₆₇ C ₁₇₉ O ₁₄₀ V ₁₇₄
BMX-Magna	B ₁₅₇ C ₁₇₉ O ₁₄₆ V ₂₀₄
Willians	A ₁₁₇ B ₁₄₁ C ₁₅₈ O ₂₄₁ S ₉₅ V ₂₁₃

5. CONCLUSÃO

- a) Os marcadores microssatélites mostraram-se eficientes nas análises das cultivares de soja, sendo identificados 6 *loci* com elevados valores de diversidade genética, os quais são capazes de diferenciar todas as 48 cultivares de soja analisadas.

- b) Estabeleceu-se um novo sistema de identificação genética de cultivares de soja baseado em uma tecnologia rápida, econômica e, mais importante, de alto poder de resolução para testes de distinguibilidade genética.

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.

AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, 132:1131- 1139, 1992.

AKKAYA, M.S.; SHOEMAKER, R.C.; SPECHT, J.E.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. **Crop Science**, 35:1439-1445, 1995.

ALCÂNTARA-NETO, F. **Marcadores microssatélites na identificação de cultivares de soja**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 57p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

ALMEIDA, L.A.; KIIHL, R.A.S.; ABDELNOOR, R.V. Melhoramento de Soja. In: ABREU, A.F.B.; GONCALVES, F.M.A.; MARQUES JR, O.G.; RIBEIRO, P.H.E. (eds). Lavras, 1997. **Resumos Expandidos...** Simpósio sobre atualização em genética e melhoramento de plantas. LAVRAS: Editora UFLA/GEN, 1997. p. 126-132.

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

ANTI, A.B. Caracterização de germoplasma de soja e de feijão através de eletroforese de isoenzimas da semente. **Bragantia**, 59:139-142, 2000.

ARULSEKAR, S.; PARFITT, D.E. Isozymes analyses procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio, and fig. **HortScience**, 21:928-933, 1986.

BERTINI, C.H.M. **Caracterização e análise de diversidade genética em algodoeiro herbáceo por marcadores microssatélites e genealogia**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004, 109p. Tese (Doutorado em Fitotecnia).

BERTRAND, J.P.; LAURENT, C.; LECLERCQ, V. **O mundo da soja**. São Paulo: Hucitec, 1987. 139p.

BONATO, A.L.V. **Avaliação da diversidade genética entre cultivares brasileiras de soja, através de marcadores AFLP**. Piracicaba: Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, 2000. 89p. Tese (Doutorado em Agronomia).

BONETTI, L.P. Cultivares e seu melhoramento genético. In: VERNETTI, F.J. (coord.). **Soja, genética e melhoramento**. Campinas: Fundação Cargil, 1983. p. 741-800.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa. UFV, 2006. 374p.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, 32:314–331, 1980.

BRASIL. **Decreto-lei 9.456 de 28 de abril de 1997. Lei de proteção de cultivares**. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Seção 1, 28, abril, 1997. p. 79.

BRATAGNAR, P.S. Importance and future prospects for genetic diversity for yield improvement. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 1999, Chicago. **Proceedings...** Chicago: World Soybean Research, 1999. p. 185.

BROGIN, R.L. **Mapeamento de genes de resistência à ferrugem e de QTLs envolvidos na resistência à septoriose em soja**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005. 106 p. Tese (Doutorado em Agronomia).

CHEN, Y.; NELSON, R.L. Relationship between Origin and Genetic Diversity in Chinese Soybean Germplasm. Crop Science Society of America. **Crop Science**, 45:1645-1652, 2005.

CLUNIES-ROSS, T. Mangolds, manure and mixtures: the importance of crop diversity on British farms. **Ecologist**, 25:181-187, 1995.

CONAB. **Balança do Agronegócio – BRASIL, Exportações brasileiras: Janeiro de 2010**. Brasília: Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/indicadores/0205-balanca-exportacao.pdf>. Acesso em: 21, janeiro, 2010a.

CONAB. **Central de Informações agropecuárias. SOJA – BRASIL, Série Histórica de Produção, Safras 1976/77 a 2009/10, em mil toneladas: Janeiro de 2010**. Brasília: Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/SojaSerieHist.xls>. Acesso em: 21, janeiro, 2010b.

CONCIBIDO, V.C.; DIERS, B.W.; ARELLI, P.R. A decade of QTL mapping for cyst nematode resistance in soybean. **Crop Science**, 4:1121-1131, 2004.

COSTA, J.A.; PIRES, J.L.F.; THOMAS, A.L.; ALBERTON, M. Comprimento e índice de expansão radial do hipocótilo de cultivares de soja. **Ciência Rural**, 29:609-612, 1999.

CREGAN P.B.; BHAGWAT A.A.; AKKAYA M.S.; JIANG R. Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean CREGAN P.B.; BHAGWAT A.A.; AKKAYA M.S.; JIANG, R. Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, 5:49-61, 1994

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

DORCHESTER, C.S. Seed and seedling characters in certain varieties of soybeans. **Journal American Society Agronomy**, 37:223-232, 1945.

EDWARD, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H.A.; CASKEY, C.T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **America Journal of Human Genetics**, 49:746-756, 1991.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja região Central do Brasil 2005**. Londrina: Embrapa, 2004. 242p.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja região Central do Brasil 2009/2010**. Londrina: Embrapa, 2008. 263p.

FREGEAU, C.J.; FOURNEY, R.M. DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: a sensitive and accurate approach to human identification. **Biotechniques**, 15:100-119, 1993.

FUGANTI, R.; BENEVENTI, M.A.; SILVA, J.F.V.; ARIAS, C.A.A.; MARIN, S.R.R.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A.L. Identificação de marcadores moleculares de microssatélites para seleção de genótipos de soja resistentes a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, 28:125-130, 2004.

GIZLICE, Z.; CARTER JR, T.E.; GERIG, T.M.; BRUTON, J.W. Genetic basic for North American public soybeans cultivars released between 1947 and 1988. **Crop Science**, 4:1143-1151, 1994.

GIZLICE, Z.; CARTER JR., T.E.; BRUTON, J.W. Genetic diversity in North American soybean: I. Multivariate analysis of founding stock and relation to coefficient of parentage. **Crop Science**, 33:614-620, 1993.

GLAZCO, V.I.; DUBIN, A.V.; GLAZCO, G.V. Genetic interrelations between soybeans varieties, evaluated with the use of ISSR markers. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, Chicago. 1999, Chicago. **Proceedings**... Chicago: World Soybean Research, 1999. p. 515-516.

HASSE, G.; BUENO, F. **O Brasil da soja: abrindo fronteiras, semeando cidades**. Porto Alegre: Ceval Alimentos, 1996. 256p.

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

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**, 314:67-73, 1985.

KEIM, P.; BEAVIS W.; SCHUPP J.; FREESTONE R. Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germplasm. **Theoretical And Applied Genetics**, 85:205-212, 1992.

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

KEIM, P.; SHOEMAKER, R.C; PALMER, R.G. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, 77:786-792, 1989.

KIIHL, R.A.S.; BAYS, I.A.; ALMEIDA, L.A. Soybean breeding for the brazilian tropics. In: SHANMUGASUNDARAM, S.; SULZBERGER, E.W.; MCLEAN, B.T. (eds). **Soybean in Tropical and Subtropical Cropping Systems**. Japan: Jircas,1986. p. 141-144.

KNITTLE, K.H.; BURRIS, J.S. Soybean hypocotyl growth under field conditions. **Crop Science**, 19:37-41, 1979.

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

LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution**, 4:203-221, 1987.

LIMA, M.R.M.S. **Caracterização de cultivares de *Prunus persica* (L.) Batsch através de marcadores moleculares**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. 2001. 33p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal).

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, 44:397-401, 1989.

MILACH, S.C. Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: BORÉM, A.; DEL GIÚDICE, M.P.; SAKIYAMA, N.S; MOREIRA, M.A.; PORTUGAL, R.S. (eds.). **Biowork I**. Viçosa: UFV, 1998. p. 43-58.

MORAIS, A.A.C.; SILVA, A.L. **Soja**: suas aplicações. São Paulo: MEDSI, 1996. 259p.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, 3:175-182, 1993.

MULCAHY, D.L.; CRESTI, M.; SANSAVINI, S.; DOUGLAS, G.C.; LINSKENS, H.F.; BERGAMINI MULCAHY, G.; VIGNANI, R.; PANCALDI, M. The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genotypes. **Scientia Horticulturae**, 54:89-96, 1993.

MÜLLER, L. Taxonomia e morfologia. In: MIYASAKA, S; MEDINA, J.C. (eds.). **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 65-108.

NÓBREGA, L.H.P.; VIEIRA, R.D. Avaliação e classificação de cultivares de soja quanto ao comprimento do hipocótilo, sob condições de laboratório e de casa de vegetação. **Revista Brasileira de Sementes**, 17:160-164, 1995.

NOGUEIRA, A.P.O.; SEDIYAMA T.; CRUZ, C.D.; REIS, M.S.; PEREIRA, D.G.; JANGARELLI, M. Novas características para diferenciação de cultivares de soja pela análise discriminante. **Ciência Rural**, 38:2427-2433, 2008.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, 85:985-93, 1993.

PRIOLLI, R.H.G.; MENDES-JUNIOR, C.T.; SOUSA, S.M.B.; SOUSA, N.E.A.; CONTEL, E.P.B. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 39:967-975, 2004.

RONGWEN, J.; AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; LAVI, U.; CREGAN, P.B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, 90:43-48, 1995.

SANSAVINI, S. Biotecnologie frutticole: le nuove frontiere delle ricerche per il miglioramento genetico e la propagazione delle piante da frutto. **Frutticoltura**, 5:75-81, 1998.

SCHULER, G.D.; BOGUSKI, M.S.; STEWART, E. A.; STEIN, L.D.; GYAPAY, G.; RICE, K.; WHITE, R.E.; RODRIGUEZ-TOMÉ, P.; AGGARWAL, A.; BAJOREK, E.; BENTOLILA, S.; BIRREN, B.B.; BUTLER, A.; CASTLE, A.B.; CHIANNILKULCHAI, N.; CHU, A.; CLEE, C.; COWLES, S.; DAY, P.J.R.; DIBLING, T.; DROUOT, N.; DUNHAM, I.; DUPRAT, S.; EAST, C.; EDWARDS, C.; FAN, J.-B.; FANG, N.; FIZAMES, C.; GARRETT, C.; GREEN, L.; HADLEY, D.; HARRIS, M.; HARRISON, P.; BRADY, S.; HICKS, A.; HOLLOWAY, E.; HUI, L.; HUSSAIN, S.; LOUIS-DIT-SULLY, C.; MA, J.; MACGILVERY, A.; MADER, C.; MARATUKULAM, A.; MATISE, T.C.; MCKUSICK, K.B.; MORISSETTE, J.; MUNGALL, A.; MUSELET, D.; NUSBAUM, H.C.; PAGE, D.C.; PECK, A.; PERKINS, S.; PIERCY, M.; QIN, F.; QUACKENBUSH, J.; RANBY, S.; REIF, T.; ROZEN, S.; SANDERS, C.; SHE, X.; SILVA, J.; SLONIM, D.K.; SODERLUND, C.; SUN, W.-L.; TABAR, P.; THANGARAJAH, T.; VEGA-CZARNY, N.; VOLLRATH, D.; VOYTICKY, S.; WILMER, T.; WU, X.; ADAMS, M.D.; AUFRAY, C.; WALTER, N.A.R.; BRANDON, R.; DEHEJIA, A.; GOODFELLOW, P.N.; HOULGATTE, R.; HUDSON JR., J.R.; IDE, S.E.; IORIO, K.R.; LEE, W.Y.; SEKI, N.; NAGASE, T.; ISHIKAWA, K.; NOMURA, N.; PHILLIPS, C.; POLYMEROPOULOS, M.H.; SANDUSKY, M.; SCHMITT, K.; BERRY, R.; SWANSON, K.; TORRES, R.; VENTER, J.C.; SIKELA, J.M.; BECKMANN, J.S.; WEISSENBACH, J.; MYERS, R.M.; COX, D.R.; JAMES, M.R.; BENTLEY, D.; DELOUKAS, P.; LANDER, E.S.; HUDSON, T.J. A gene map of the human genome. **Science**, 274:540-546, 1996.

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

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R.C.; REIS, M.S. Melhoramento da soja. In: BORÉM, A. (Eds.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 487-533.

SENIOR, M.L.; MURPHY, J.P.; GOODMAN, M.M.; STUBER, C.W. Utility of SSRs for determining genetics similarities and relationships in maize using an agarose gel system. **Crop Science**, 38:1088-1098, 1998.

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

SILVA, J.C.; MAIA, G.L.; MEYER, M.C. Occurrence of asian soybean rust on irrigated fields in Maranhão. In: VII WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE. Londrina. 2004. Abstracts of contributed papers and posters. Londrina: Embrapa Soybean, 2004. p. 212-213

SMITH, J.S.C.; CHIN, E.C.L.; SHU, H.; SMITH, O.S.; WALL, S.J.; SENIOR, M.L.; MITCHELL, S.E.; KRESOVITH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize: Comparisons with data from RFLPs and pedigree. **Theoretical and applied Genetics**, 95:163-172, 1997.

SMITH, S.; HELENTJARIS, T. DNA fingerprinting and plant variety protection. In: PATERSON, A.H. (eds.). **Genome Mapping in plants**. New York: Academic Press, 1996. p. 95-110.

SNPC. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento II, 1999. 6p. (Informativo técnico).

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.

SOSINSKI, B.; GANNAVAPU, M.; HAGER, L.D. Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. **Theoretical and Applied Genetics**, 101:421-428, 2000.

TANKSLEY, S.D.; McCOUCH, S.R. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. **Science**, 277:1063-1066, 1997.

THOMAS, M.R.; SCOTT, W.S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms whwm analyzed as sequence tagged sites. **Theoretical and Applied Genetics**, 86:985-990, 1993.

USDA. United States Department of Agriculture. **Foreign Agricultural Service**. Janeiro de 2010. Washington. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdquery.aspx>. Acesso em: 21, janeiro, 2010.

VASCONCELOS, M.J.V.; BARROS E.G.; MOREIRA, M.A.; VIEIRA, C. Genetic diversity of the common bean *Phaseolus vulgaris* L. determined by DNA-based molecular markers. **Brazilian Journal of Genetics**, 19:447-451, 1996.

VELLO, N.A.; HIROMOTO, D.M.; AZEVEDO-FILHO, A.J.B.V. Coefficient of parentage and breeding of Brazilian soybean germoplasma. **Revista Brasileira de Genética**, 11:679-697, 1998.

VELLVÉ, R. The decline of diversity in European agriculture. **Ecologist**, 23:64-69, 1993.

VIEIRA, E.S.N. **Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores morfológicos e moleculares visando à certificação da pureza genética**. Lavras: Universidade Federal de Lavras 2000, 84p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia).

VINATZER, B.; PANCALDI, M.; SANSAVINI, S. Potenzialità e limiti Del "fingerprinting" nell'identificazione varietale del pesco. **Frutticoltura**, 4:97-101, 1999.

WEIR, B.S. Genetics data analysis methods for discrete genetic data. Sunderland: Sinauer **Associates**, 1990. 445p.

WILLIAMS, J.A.; SCOTT, I.M.; ATKIN, A.L.; BROOK, W.J.; RUSSELL, M.A.; BELL, J.B. Genetic and molecular analysis of vg^U and vg^W : two dominant vg alleles associated with gene fusions in *Drosophila*. **Genetics**, 125:833-844, 1990a.

WILLIAMS, J.G.K.; K. UBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18:6531-6535, 1990b.

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**, 9:28-28, 2008.

YANG, G.; SAGHAI-MAROOF, M.A.; XU, C.G.; ZHANG, Q.; BIYASHEV, R.M. Comparative analyses of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. **Molecular and General Genetics**, 245:187-194, 1994.

ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application N° 0534858 A1. 1993.

APÊNDICES

Quadro 1A - Marcação FAM para Prova (P) e Contra-Prova (CP), nos 24 *loci* microsatélites analisados nas 48 cultivares de soja e, seus respectivos alelos, em pares de base, obtidos via sequenciador automático

Amostra	Cultivar	Sat_038		Satt005		Satt009		Sat_085		Satt046		Satt079		Sct_001	
		P	CP	P	CP	P	CP	P	CP	P	CP	P	CP	P	CP
1	BRS Juliana RR	244	244	179	179	199	199	196	196	171	171	-	-	188	189
2	BRS Gisele RR	244	244	154	154	214	214	171	171	171	171	-	-	188	189
3	BRS MG 850G RR	200	200	179	179	220	220	196	196	-	-	247	247	173	174
4	BRS255RR	244	244	157	157	214	214	171	171	171	171	247	247	188	189
5	BRS256RR	200	200	154	154	214	214	171	171	171	171	247	247	188	189
6	BRS270RR	200	200	157	157	223	223	171	171	171	171	200	200	188	189
7	BRS Favorita	240	240	179	179	214	214	205	205	171	171	247	247	188	189
8	BRS 243 RR	240	240	144	144	199	199	196	196	171	171	247	247	158	159
9	BRS246RR	240	240	144	144	217	217	171	171	236	236	200	200	184	185
10	BRS Charruá RR	244	244	154	154	158	158	196	196	171	171	247	247	197	198
11	BRS Tracajá	244	244	157	157	182	182	196	196	171	171	247	247	173	174
12	BRS Macota	240	240	138	138	214	214	196	196	171	171	247	247	173	174
13	BRS GO Mineiros	160	160	141	141	214	214	196	196	171	171	-	-	188	189
14	BRS213	200	200	175	175	214	214	208	208	171	171	247	247	188	189
15	BRS Caiapônia	149	149	131	131	214	214	-	-	171	171	217	217	188	189
16	BRS257	200	200	141	141	179	179	171	171	171	171	217	217	188	189
17	BRS133	240	240	131	131	214	214	-	-	171	171	217	217	188	189
18	Embrapa 48	240	240	172	172	182	182	208	208	171	171	217	217	188	189
19	BRS Invernada	160	160	172	172	204	204	208	208	171	171	207	207	188	189
20	BRS184	240	240	172	172	214	214	208	208	171	171	207	207	188	189
21	BRS217 [Flora]	244	244	144	144	220	220	196	196	171	171	140	140	197	198
22	BRS218 [Nina]	248	248	154	154	199	199	208	208	-	-	140	140	225	226
23	BRS Jiripoca	248	248	157	157	217	217	171	171	171	171	140	140	231	232
24	BRS GO Luziânia	244	244	144	144	150	150	196	196	171	171	140	140	231	232
25	BRS GO 204 Goiânia	244	244	141	141	214	214	196	196	171	171	140	140	231	232

Quadro 1A, Cont...

26	BRS Torena	244	244	157	157	217	217	171	171	222	222	140	140	225	226
27	BRS GO Raissa	129	129	157	157	167	167	171	171	171	171	140	140	231	232
28	MG/BR 46 (Conquista)	240	240	141	141	214	214	196	196	171	171	233	233	231	232
29	BRS Gralha	135	135	157	157	158	158	196	196	171	171	140	140	225	226
30	MS/BR39 (Chapadão)	244	244	157	157	179	179	-	-	171	171	140	140	225	226
31	BRS GO Jataí	135	135	157	157	150	150	196	196	171	171	140	140	225	226
32	BRS Simbaíba	232	232	138	138	172	172	186	186	215	215	140	140	149	150
33	BRS Barreiras	232	232	138	138	172	172	167	167	218	218	140	140	158	159
34	BRS Raimunda	232	232	138	138	172	172	167	167	215	215	140	140	158	159
35	BRS GO Chapadões	240	240	138	138	172	172	167	167	-	-	140	140	-	-
36	BRS 263 [Diferente]	232	232	138	138	172	172	167	167	159	159	247	247	158	159
37	BRSGO Aracu	232	232	138	138	172	172	167	167	-	-	-	-	158	159
38	BRSMG-810c	232	232	138	138	172	172	167	167	222	222	-	-	158	159
39	BRS Tianá	226	226	138	138	172	172	167	167	180	180	-	-	-	-
40	BRSGO-Graciosa	232	232	141	141	223	223	-	-	215	215	-	-	-	-
41	M-soy-7501	232	232	138	138	172	172	167	167	202	202	-	-	-	-
42	CD 201	200	200	138	138	172	172	167	167	222	222	-	-	-	-
43	NK412113	240	240	138	138	172	172	174	174	159	159	-	-	158	159
44	BRS258	237	237	141	141	167	167	196	196	171	171	-	-	197	198
45	BRS282	244	244	157	157	214	214	171	171	171	171	-	-	170	171
46	BRS284	-	-	167	167	179	179	-	-	239	239	-	-	-	-
47	BMX-Magna	-	-	157	157	179	179	-	-	218	218	-	-	-	-
48	Willians	117	117	141	141	158	158	205	205	222	222	148	148	188	189

* (-) Dados perdidos

Quadro 2A - Marcação HEX para Prova (P) e Contra-Prova (CP), nos 24 *loci* microsatélites analisados nas 48 cultivares de soja e, seus respectivos alelos, em pares de base, obtidos via sequenciador automático

Amostra	Cultivar	Satt045		GMABAB		Satt042		Satt431*		Satt586		Sat_064		Satt612		Sct_187	
		P	CP	P	CP	P	CP	P	CP	P	CP	P	CP	P	CP	P	CP
1	BRS Juliana RR	129	129	144	144	77	77	200	200	185	185	204	204	189	189	137	137
2	BRS Gisele RR	129	129	144	144	77	77	185	185	197	197	201	201	189	189	145	145
3	BRS MG 850G RR	129	129	144	144	77	77	227	227	197	197	-	-	174	174	145	145
4	BRS255RR	129	129	141	141	77	77	185	185	204	204	173	173	189	189	145	145
5	BRS256RR	135	135	144	144	77	77	227	227	197	197	173	173	189	189	145	145
6	BRS270RR	135	135	141	141	77	77	185	185	200	200	204	204	189	189	145	145
7	BRS Favorita	135	135	144	144	77	77	227	227	208	208	204	204	189	189	121	121
8	BRS 243 RR	129	129	144	144	167	167	185	185	197	197	173	173	166	166	145	145
9	BRS246RR	129	129	156	156	77	77	227	227	197	197	213	213	185	185	137	137
10	BRS Charruá RR	135	135	156	156	77	77	227	227	200	200	195	195	198	198	137	137
11	BRS Tracajá	90	90	156	156	77	77	196	196	197	197	173	173	174	174	145	145
12	BRS Macota	129	129	156	156	77	77	196	196	232	232	204	204	174	174	237	237
13	BRS GO Mineiros	129	129	156	156	167	167	196	196	232	232	204	204	189	189	140	140
14	BRS213	129	129	144	144	77	77	196	196	208	208	173	173	189	189	244	244
15	BRS Caiapônia	135	135	144	144	77	77	196	196	197	197	204	204	189	189	241	241
16	BRS257	129	129	160	160	77	77	185	185	200	200	173	173	189	189	234	234
17	BRS133	129	129	156	156	77	77	196	196	232	232	204	204	189	189	140	140
18	Embrapa 48	135	135	144	144	77	77	185	185	208	208	204	204	189	189	140	140
19	BRS Invernada	90	90	144	144	77	77	185	185	208	208	204	204	189	189	121	121
20	BRS184	90	90	144	144	77	77	227	227	208	208	204	204	189	189	137	137
21	BRS217 [Flora]	135	135	144	144	167	167	231	231	200	200	173	173	122	122	121	121
22	BRS218 [Nina]	129	129	-	-	170	170	196	196	208	208	-	-	185	185	121	121
23	BRS Jiripoca	129	129	156	156	167	167	231	231	200	200	204	204	146	146	83	83
24	BRS GO Luziania	135	135	144	144	167	167	185	185	200	200	204	204	140	140	137	137
25	BRS GO 204 Goiânia	135	135	144	144	164	164	227	227	200	200	204	204	166	166	114	114

Quadro 2A, Cont...

48

26	BRS Torena	129	129	221	221	170	170	185	185	208	208	173	173	140	140	137	137
27	BRS GO Raissa	129	129	156	156	167	167	185	185	200	200	173	173	146	146	145	145
28	MG/BR 46 (Conquista)	129	129	156	156	167	167	196	196	232	232	204	204	140	140	137	137
29	BRS Gralha	135	135	141	141	164	164	231	231	197	197	-	-	198	198	121	121
30	MS/BR39 (Chapadão)	129	129	156	156	164	164	185	185	-	-	173	173	189	189	83	83
31	BRS GO Jatai	90	90	160	160	164	164	196	196	197	197	-	-	174	174	137	137
32	BRS Sambaiba	129	129	-	-	173	173	215	215	185	185	170	170	130	130	145	145
33	BRS Barreiras	135	135	144	144	173	173	209	209	228	228	164	164	135	135	145	145
34	BRS Raimunda	129	129	-	-	170	170	196	196	185	185	164	164	135	135	126	126
35	BRS GO Chapadoes	112	112	-	-	173	173	196	196	225	225	-	-	-	-	140	140
36	BRS 263 [Diferente]	-	-	144	144	173	173	231	231	185	185	151	151	130	130	145	145
37	BRSGO Aracu	129	129	-	-	173	173	200	200	228	228	-	-	130	130	145	145
38	BRSMG-810c	-	-	-	-	173	173	200	200	228	228	164	164	130	130	140	140
39	BRS Tianá	129	129	144	144	173	173	200	200	189	189	164	164	146	146	145	145
40	BRSGO-Graciosa	129	129	144	144	173	173	215	215	212	212	170	170	146	146	145	145
41	M-soy-7501	158	158	238	238	170	170	200	200	228	228	164	164	140	140	145	145
42	CD 201	-	-	141	141	130	130	200	200	197	197	164	164	135	135	-	-
43	NK412113	158	158	144	144	173	173	215	215	228	228	170	170	146	146	145	145
44	BRS258	135	135	156	156	77	77	227	227	197	197	173	173	146	146	145	145
45	BRS282	129	129	144	144	77	77	185	185	200	200	204	204	146	146	145	145
46	BRS284	-	-	-	-	-	-	200	200	212	212	-	-	140	140	-	-
47	BMX-Magna	129	129	227	227	167	167	227	227	197	197	-	-	146	146	-	-
48	Willians	140	140	160	160	170	170	250	250	212	212	146	146	241	241	145	145

* (-) Dados perdidos

Quadro 3A - Marcação NED para Prova (P) e Contra-Prova (CP), nos 24 *loci* microsatélites analisados nas 48 cultivares de soja e, seus respectivos alelos, em pares de base, obtidos via sequenciador automático

Amostra	Cultivar	Satt114		Satt002		Satt540		Satt100		Satt233		Satt181		Satt070		Satt288	
		P	CP	P	CP	P	CP	P	CP	P	CP	P	CP	P	CP	P	CP
1	BRS Juliana RR	114	114	127	127	144	144	141	141	184	184	204	204	143	143	244	244
2	BRS Gisele RR	102	102	127	127	164	164	141	141	195	195	200	200	143	143	244	244
3	BRS MG 850G RR	102	102	121	121	164	164	134	134	184	184	204	204	169	169	244	244
4	BRS255RR	90	90	127	127	144	144	141	141	204	204	158	158	169	169	244	244
5	BRS256RR	90	90	127	127	144	144	134	134	184	184	174	174	143	143	244	244
6	BRS270RR	90	90	127	127	144	144	141	141	195	195	204	204	143	143	234	234
7	BRS Favorita	90	90	121	121	164	164	141	141	184	184	204	204	143	143	241	241
8	BRS 243 RR	74	74	127	127	149	149	141	141	195	195	174	174	143	143	244	244
9	BRS246RR	74	74	127	127	149	149	141	141	204	204	213	213	143	143	231	231
10	BRS Charruá RR	90	90	127	127	164	164	141	141	184	184	195	195	143	143	237	237
11	BRS Tracajá	90	90	121	121	149	149	141	141	204	204	174	174	143	143	234	234
12	BRS Macota	74	74	134	134	149	149	141	141	184	184	204	204	143	143	237	237
13	BRS GO Mineiros	74	74	134	134	149	149	141	141	184	184	204	204	143	143	244	244
14	BRS213	74	74	121	121	141	141	141	141	204	204	174	174	169	169	244	244
15	BRS Caiapônia	74	74	121	121	160	160	141	141	184	184	204	204	143	143	241	241
16	BRS257	90	90	121	121	160	160	141	141	184	184	174	174	172	172	234	234
17	BRS133	74	74	134	134	149	149	199	199	184	184	204	204	143	143	244	244
18	Embrapa 48	90	90	121	121	160	160	184	184	184	184	204	204	143	143	237	237
19	BRS Invernada	90	90	127	127	164	164	184	184	195	195	204	204	143	143	237	237
20	BRS184	90	90	121	121	164	164	141	141	184	184	204	204	143	143	237	237
21	BRS217 [Flora]	74	74	127	127	164	164	138	138	200	200	200	200	160	160	219	219
22	BRS218 [Nina]	74	74	121	121	149	149	141	141	200	200	195	195	144	144	237	237
23	BRS Jiripoca	90	90	127	127	164	164	141	141	195	195	204	204	172	172	146	146
24	BRS GO Luziania	74	74	127	127	149	149	141	141	200	200	204	204	160	160	244	244
25	BRS GO 204 Goiânia	74	74	127	127	160	160	141	141	184	184	204	204	143	143	244	244

Quadro 3A, Cont...

50

26	BRS Torena	74	74	138	138	-	-	141	141	195	195	174	174	88	88	237	237
27	BRS GO Raissa	90	90	199	199	100	100	141	141	195	195	195	195	100	100	244	244
28	MG/BR 46 (Conquista)	74	74	134	134	149	149	141	141	204	204	204	204	100	100	244	244
29	BRS Gralha	90	90	138	138	100	100	128	128	195	195	174	174	80	80	212	212
30	MS/BR39 (Chapadão)	90	90	138	138	100	100	141	141	-	-	174	174	100	100	146	146
31	BRS GO Jatai	90	90	199	199	100	100	134	134	200	200	174	174	88	88	219	219
32	BRS Sambaiba	139	139	138	138	173	173	184	184	184	184	158	158	150	150	244	244
33	BRS Barreiras	139	139	138	138	160	160	196	196	200	200	167	167	199	199	244	244
34	BRS Raimunda	139	139	138	138	173	173	196	196	184	184	164	164	160	160	244	244
35	BRS GO Chapadoes	139	139	138	138	173	173	196	196	200	200	-	-	-	-	244	244
36	BRS 263 [Diferente]	139	139	138	138	173	173	196	196	184	184	151	151	199	199	244	244
37	BRSGO Aracu	159	159	138	138	160	160	196	196	200	200	204	204	160	160	244	244
38	BRSMG-810c	159	159	138	138	160	160	196	196	195	195	164	164	199	199	244	244
39	BRS Tianá	142	142	138	138	149	149	205	205	189	189	158	158	-	-	244	244
40	BRSGO-Graciosa	139	139	138	138	173	173	184	184	184	184	151	151	-	-	244	244
41	M-soy-7501	142	142	138	138	164	164	196	196	200	200	167	167	-	-	244	244
42	CD 201	139	139	138	138	160	160	196	196	200	200	167	167	160	160	-	-
43	NK412113	142	142	138	138	160	160	196	196	200	200	151	151	160	160	244	244
44	BRS258	90	90	127	127	164	164	141	141	195	195	174	174	143	143	237	237
45	BRS282	90	90	127	127	144	144	141	141	200	200	204	204	169	169	244	244
46	BRS284	-	-	121	121	-	-	-	-	195	195	174	174	-	-	-	-
47	BMX-Magna	102	102	121	121	-	-	-	-	195	195	204	204	-	-	244	244
48	Willians	109	109	160	160	95	95	163	163	243	243	213	213	104	104	216	216

* (-) Dados perdidos.