

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
CULTIVARES BRASILEIRAS DE SOJA PORTADORAS DE
GENE RR**

Otávia Tiago Villela
Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
CULTIVARES BRASILEIRAS DE SOJA PORTADORAS DE
GENE RR**

Otávia Tiago Villela

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Helena Unêda-Trevisoli

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Orlando Di Mauro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SP

Abril – 2013

V712d Villela, Otávia Tiago
Diversidade fenotípica e molecular de cultivares brasileiras de soja portadoras de gene RR / Otávia Tiago Villela. -- Jaboticabal, 2013
iv, 80 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Sandra Helena Unêda-Trevisoli
Co-orientador: Antonio orlando di Mauro
Banca examinadora: Dilermando Perecin, Maria Imaculada Zucchi
Bibliografia

1. *Glycine max*. 2. Caracteres fenotípicos. 3. SSR. 4. Variabilidade genética I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.34:631.52



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: DIVERSIDADE FENOTÍPICA E MOLECULAR DE CULTIVARES BRASILEIRAS DE SOJA PORTADORAS DE GENE RR

AUTORA: OTÁVIA TIAGO VILLELA

ORIENTADORA: Profa. Dra. SANDRA HELENA UNÊDA TREVISOLI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO ORLANDO DI MAURO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. SANDRA HELENA UNÊDA TREVISOLI

Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. DILERMANDO PERECIN

Departamento de Ciências Exatas / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. MARIA IMACULADA ZUCCHI

Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios / Piracicaba/SP

Data da realização: 26 de abril de 2013.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

OTÁVIA TIAGO VILLELA – nascida em 18 de outubro de 1985 na cidade de Barretos – SP, é Engenheira Agrônoma formada pela Universidade Estadual de Londrina, PR, em janeiro de 2009. Em 2007 foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES para extensão universitária pela Ècole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse - ENSAT, Auzeville, França. Foi bolsista de iniciação científica, em 2008, pelo Instituto Agrônômico do Paraná, Londrina – PR, no Laboratório de Biotecnologia Vegetal. Em março de 2011 ingressou no Programa de Pós-graduação em Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/UNESP), Jaboticabal – SP, sob orientação da Profa. Dra. Sandra Helena Unêda-Trevisoli e coorientação do Prof. Dr. Antonio Orlando Di Mauro.

***“Tudo é do pai
Toda honra e toda glória
É dele a vitória
alcançada em minha vida”***

Frederico Cruz

Aos meus avós maternos Demétria e Abílio e paternos Adélia e Otávio (*in memoriam*),
que mesmo cansados pela idade avançada, nunca me negaram um ensinamento ou
uma palavra de apoio

Aos meus pais Zulma e Manoel,
por serem os melhores pais, amigos, conselheiros
e por estarem sempre ao meu lado, em todos os momentos dessa jornada

Aos meus irmãos Manoel Filho e Olavo,
pelo carinho e companheirismo

Ao meu namorado Laerte,
por todos os momentos compartilhados,
pela ajuda e compreensão
E por me fazer feliz todos os dias

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, sobretudo.

À Universidade Estadual Paulista – FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal e ao curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realização do mestrado.

À CAPES, pela concessão do auxílio financeiro.

À Profa. Dra. Sandra Helena Unêda-Trevisoli, pela orientação, atenção e ensinamentos proporcionados.

Ao Prof. Dr. Antonio Orlando Di Mauro, pela coorientação.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da FCAV/UNESP. Em especial aos Professores Rinaldo Cesar de Paula e Luciana Rossini Pinto.

Aos amigos-irmãos Fabiana Mota da Silva e Daniel Carvalho Leite pelo apoio, conselhos, ajuda na realização deste trabalho e, acima de tudo, amizade verdadeira.

Ao meu namorado Laerte Souza Bárbaro Júnior por ser meu amor e amigo, pelo incentivo e também pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas Viviane Vianna, Eduardo Bizari, Mariana Silva Rosa, Anderson Dallastra, Aretha Arcenio, Rafael Finholdt, Sybelli Spindola, Bruno Vieira, Renata Pires, José Arantes, Guillermo Gomez e todos os estagiários, pelos conhecimentos compartilhados, ajuda na condução dos experimentos, apoio e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal da FCAV/UNESP Mauro, Tito, Sebastião, Faro, Mônica e, especialmente Geraldo, por além da amizade, o auxílio fundamental na condução do experimento.

Aos meus queridos amigos Mayara Mari Murata, Marcela Yada e Paolo Zancanaro pelo incentivo, carinho e amizade sincera durante esse dois anos.

Às amigas de sempre Luciana, Alessandra, Marília, Daniela, Aline e Adriana, pelo incentivo, carinho e por fazerem parte de todas as minhas boas lembranças.

A toda minha família, meus pais Manoel e Zulma, meus irmãos Manoel Filho e Olavo, meus avós Abílio e Demétria, minha adorada vovó Adélia, minhas primas Fabiana, Eloisa e Elaine Cristina, pela força e confiança, me ajudando a superar os obstáculos sempre com otimismo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A cultura da soja.....	3
2.2 Importância econômica	4
2.3 Soja Roundup Ready®	5
2.3.1 Inserção e utilização do gene CP4-EPSPS	5
2.3.2 Soja Roundup Ready® vs Soja Convencional.....	7
2.3.3 Produção e comercialização de soja Roundup Ready® no Brasil.....	9
2.4 Estudo da base genética.....	10
2.5 Diversidade genética.....	11
2.6 Técnicas de análises multivariadas na avaliação da diversidade genética.....	12
2.6.1 Análise de agrupamento.....	12
2.6.2 Análise por componentes principais	14
2.7 Diversidade com base em caracteres fenotípicos.....	15
2.8 Diversidade com base em marcadores moleculares.....	16
2.9 Marcadores moleculares microssatélites	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Material genético.....	19
3.2 Instalação do experimento em campo	19
3.3 Caracteres agronômicos	20
3.4 Análise da diversidade fenotípica com base em caracteres agronômicos	22
3.4.1 Distância Euclidiana (d_{ij}).....	22
3.4.2 Análises de Agrupamento.....	23
3.4.3 Análise por componentes principais	24
3.5 Análises moleculares	24
3.5.1 Coleta do tecido vegetal e extração de DNA	25
3.5.2 Iniciadores microssatélites.....	25
3.5.3 Reação de amplificação.....	25
3.5.4 Visualização dos resultados e análise do polimorfismo	26

3.6 Análise da diversidade genética com base em marcadores SSRs.....	26
3.7 Correlação entre medidas de dissimilaridade obtidas a partir de dados fenotípicos e moleculares	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Diversidade fenotípica com base em caracteres agronômicos	28
4.2 Diversidade genética com base em marcadores moleculares	38
4.3 Comparação entre diversidade obtida a partir de caracteres fenotípicos e marcadores moleculares.....	47
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
6. CONCLUSÕES	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	52

DIVERSIDADE FENOTÍPICA E MOLECULAR DE CULTIVARES BRASILEIRAS DE SOJA PORTADORAS DE GENE RR

RESUMO – O estudo da diversidade genética e o conhecimento das relações entre cultivares melhoradas é fundamental para os programas de melhoramento de soja. Sabe-se que existe um grande número de cultivares comercializadas no Brasil entretanto, pequena variabilidade genética está disponível entre elas, em razão da estreita base genética do germoplasma brasileiro. No Brasil mais de 80% do cultivo total de soja provém de sementes geneticamente modificadas, entretanto nada se sabe sobre as relações de parentesco existentes entre os genótipos cultivados. O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade genética entre 74 cultivares de soja RR oriundas de diferentes programas de melhoramento genético. As análises foram baseadas em técnicas de estatística multivariada a partir de caracteres agronômicos e marcadores moleculares microssatélites (SSR). Dez caracteres agronômicos quantitativos foram empregados nas análises da distância Euclidiana, agrupamento por Tocher, agrupamento pelo critério UPGMA e análise por componentes principais. A diversidade genética, estimada utilizando-se marcadores moleculares, foi realizada por meio de 86 iniciadores SSR polimórficos analisados pelo coeficiente de Jaccard e pela metodologia de agrupamento UPGMA. Para os caracteres agronômicos, as cultivares foram separadas em sete grupos distintos segundo os métodos de Tocher e UPGMA. Neste estudo, a análise de componentes principais revelou que os caracteres número de dias para florescimento, produção de grãos, valor agronômico e número de dias para maturidade foram os que mais contribuíram para a diferenciação das cultivares. O dendrograma gerado com base nos dados moleculares pelo critério de agrupamento UPGMA revelou a formação de seis grupos. Os marcadores SSR amplificaram 195 alelos entre as cultivares e apresentaram valor médio de PIC de 0,42. Tanto as análises baseadas em caracteres agronômicos, quanto aquelas de marcadores moleculares SSR, foram eficientes em estimar a divergência genética existente entre as cultivares de soja portadoras do gene RR.

Palavras-chave: *Glycine max*, caracteres fenotípicos, SSR, variabilidade genética.

PHENOTYPIC AND MOLECULAR DIVERSITY OF BRAZILIAN SOYBEAN CULTIVARS THAT CARRY RR GENE

ABSTRACT - The study of genetic diversity and the knowledge of the relationships among improved cultivars is essential for soybean breeding programs. It is known that there is a large number of cultivars marketed in Brazil however, little genetic variability is available among them, due to the narrow genetic base of Brazilian germplasm. In Brazil more than 80% of the total soybean crop comes from genetically modified seeds, however nothing is known about the evolutionary relationships among these cultivated genotypes. The objective of this study was to analyze the genetic diversity among 74 RR soybean cultivars from different genetic breeding programs. Analyzes were based on multivariate statistical techniques from agronomic traits and microsatellite molecular markers (SSR). Ten quantitative agronomic traits were used in the analysis of the Euclidean distance, Tocher and UPGMA clustering and principal component analysis. Genetic diversity, estimated using molecular markers, was performed with 86 polymorphic SSR primers, analyzed by Jaccard coefficient and by UPGMA clustering method. For agronomic data, the cultivars were separated into seven distinct groups according to Tocher and UPGMA methods. Principal components analysis revealed that among the studied agronomic traits, number of days to flowering, grain yield, agronomic value and number of days to maturity were the main contributors to differentiate cultivars. The dendrogram based on the molecular data and the UPGMA criterion revealed six groups. SSR markers amplified 195 alleles among cultivars and showed 0,42, average value of PIC. Both analyzes based on agronomic traits, as SSR molecular markers were efficient in estimating the genetic divergence among soybean cultivars that carry RR gene.

Keywords: *Glycine max*, phenotypic traits, SSR, genetic variability.

1. INTRODUÇÃO

A soja é considerada uma das mais importantes “commodities” produzidas e comercializadas no mundo. Seus grãos apresentam alto teor protéico, tornando-a alimento essencial para a dieta de seres humanos e animais. Além disso, apresenta um considerável teor de óleo, que pode ser utilizado para a indústria alimentícia e para a fabricação de biocombustíveis.

O Brasil até então, destaca-se como o segundo maior produtor mundial dessa leguminosa, com produção de 66 milhões de toneladas (CONAB, 2012). A maior parte dessa produção correspondeu ao cultivo de soja geneticamente modificada. Para o ano agrícola 2012/13, a previsão é que a produção brasileira atinja cerca de 82,06 milhões de toneladas do grão (CONAB, 2013).

Com o advento da soja RR, diversas empresas de melhoramento públicas e privadas passaram a incorporar o gene RR nas suas linhagens elite (LEITÃO et al., 2010). Embora exista um grande número de cultivares de soja no Brasil, há pouca variabilidade genética entre elas, em razão principalmente, de serem originárias de poucas linhagens ancestrais, o que resulta em uma base genética estreita (HIROMOTO; VELLO 1986; BONATO et al., 2006 e WYSMIERSKI, 2010). Tal fato pode provocar consequências, como por exemplo, estabelecimento de patamares de produtividade e suscetibilidade a pragas, patógenos e estresses ambientais.

A soja transgênica Roundup Ready® (RR) foi desenvolvida por meio da introdução do gene CP4-EPSPS, que expressa uma forma modificada da enzima EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase), e permite à planta sobreviver à aplicação do herbicida glifosato (PADGETTE et al., 1995). O gene foi extraído da bactéria natural do solo *Agrobacterium tumefaciens* estirpe CP4. A obtenção da soja RR ocorreu por meio de transformação genética realizada pelo processo de biobalística, onde as células vegetais foram bombardeadas por partículas contendo os segmentos de DNA.

A utilização da tecnologia Roundup Ready® continua crescente entre os produtores e vem sendo o caráter de maior oferta pelas instituições de pesquisa, por meio das novas cultivares. Considerando a importância da soja RR para a produção brasileira e a necessidade de se desenvolver novos genótipos mais produtivos e adaptados a diferentes regiões, o estudo da diversidade deste grupo de cultivares é

extremamente importante para se conhecer a variabilidade existente entre elas e dentro dos programas de melhoramento que as originou.

Estimativas de diversidade genética por meio de análises multivariadas mostraram-se eficientes em fornecer informações sobre a variabilidade genética de várias culturas (CHIORATO et al., 2007; AMORIM et al., 2009; GOUVÊA et al., 2010). Técnicas multivariadas, como componentes principais, variáveis canônicas e de agrupamento, podem ser aplicadas no estudo da diversidade (CRUZ et al. 2011), com a vantagem de conseguir unificar múltiplas informações de um conjunto de variáveis, de interesse no melhoramento genético.

O estudo da diversidade por caracteres agronômicos, principalmente os de natureza quantitativa, é de grande interesse, tendo em vista sua importância econômica e a necessidade de se selecionar genitores superiores. Vários trabalhos que avaliam a diversidade em soja foram realizados utilizando-se análises multivariadas, baseadas em caracteres agronômicos (ALMEIDA et al., 2011; RIGON et al., 2012; PELUZIO et al., 2012).

Mais recentemente, com a tecnologia dos marcadores moleculares, tornou-se possível acessar o genótipo das espécies e detectar variabilidades genéticas, ao nível de DNA, que são herdadas geneticamente.

Os marcadores microssatélites ou SSR ("Simple Sequence Repeats") constituem uma das classes mais polimórficas e por isso são altamente utilizados em estudos de diversidade genética, análise de pedigree, filogenia e na distinção e proteção de cultivares (CAIXETA et al., 2009). O alto nível de variação detectado aumenta a resolução do estudo de genealogia e diversidade genética e reduz o número de marcadores requeridos na distinção dos genótipos. Os marcadores SSR tem sido utilizados para análise de diversidade genética em diversas espécies, incluindo feijão (BENCHIMOL et al., 2007), milho (LABORDA et al., 2005) e soja (VIEIRA et al., 2009; MULATO et al., 2010; SINGH et al., 2010).

A existência de variabilidade genética, bem como o seu conhecimento, são fatores preponderantes para um eficiente programa de melhoramento genético de plantas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade fenotípica e molecular entre 74 cultivares de soja RR, oriundas de diferentes programas de

melhoramento, utilizando-se caracteres agronômicos e marcadores moleculares microssatélites.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da soja

A soja cultivada (*Glycine max* (L.) Merrill) pertence à classe *Dicotyledoneae*, ordem *Fabales*, família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae*, gênero *Glycine* tendo como principal centro de origem a China. A espécie é autógama, herbácea, anual, ereta, de crescimento morfológico diversificado, variando de 0,3 a 2,0 metros de altura, podendo ser muito ou pouco ramificada, com ciclo de 75 a 200 dias, dependendo da variedade e das condições ambientais (SEDIYAMA; TEIXEIRA; BARROS, 2009). Apresenta número de cromossomos $2n = 40$, representando um tetraplóide diploizado, ou seja, um poliplóide que se comporta citologicamente como um diplóide (HYMOWITZ et al., 1997).

Evidências históricas relatam que a domesticação da soja começou por volta do século XI a.C. no nordeste da China, ao longo do vale do rio Amarelo, sendo este considerado o centro primário de diversidade da espécie (CHUNG; SINGH, 2008; HYMOWITZ, 2004). Entre 200 a.C. e o século III, expandiu-se para o sul da China, Coréia e Japão e até o século XVII a comercialização da soja permaneceu restrita aos países orientais. A partir da expansão marítima e comercial, a soja chegou no ocidente, inicialmente na Europa (França) em 1740 e depois nos Estados Unidos (EUA), em 1765 (HYMOWITZ, 2004). Entretanto, somente a partir de 1880, o ocidente começou a se interessar pelo cultivo da soja, quando os Estados Unidos iniciaram sua exploração comercial, primeiro como forrageira e, posteriormente como grão (CHUNG; SINGH, 2008; MIYASAKA; MEDINA, 1981).

O primeiro relato de soja no Brasil em foi em 1882, no estado da Bahia. No entanto, somente a partir de 1935 a soja começou a ser cultivada com finalidade comercial. O cultivo de soja para produção comercial de grãos teve início no Rio Grande do Sul, onde as cultivares apresentaram melhor adaptação devido à semelhança de latitude com a região sul dos EUA, de onde era proveniente a maior parte do germoplasma disponível no país (MIYASAKA; MEDINA, 1981). O Rio

Grande do Sul adquiriu grande importância na produção de soja nacional e levou o Brasil a se destacar como produtor no mercado internacional. A partir de 1970 a fronteira agrícola da soja se estendeu para os estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Bahia, Maranhão e demais Estados ao Norte e Nordeste (ROESSING; GUEDES, 1993). Um dos avanços imprescindíveis para viabilizar esta expansão foi o desenvolvimento de cultivares adaptadas a estas regiões, por meio da introdução de genes que atrasam o florescimento sob fotoperíodo indutor, ou seja, cultivares com período juvenil longo (DALL'AGNOL, 2002).

Nas décadas seguintes a soja se consolidou como a principal cultura do agronegócio brasileiro e alcançou posição de destaque entre os principais países produtores de soja no mundo. A evolução da produção de soja no Brasil foi possível a partir dos incentivos fiscais oferecidos aos produtores, da modernização tecnológica nacional e do desenvolvimento de novas tecnologias de cultivo da soja associado ao melhoramento genético (ZANCOPÉ; NASSER, 2005).

2.2 Importância econômica

A soja é considerada uma das mais importantes “commodities” produzidas e comercializadas no mundo. Destaque para a composição química de seus grãos que apresentam 40% de proteínas e 20% de óleos, constituindo-se como fonte alimentar protéica de grande importância mundial, proporcionando múltiplas utilizações comerciais e a formação de um complexo industrial destinado ao seu processamento (SEDIYAMA; TEIXEIRA; BARROS, 2009). A planta de soja e seus derivados, provenientes de seus grãos, apresentam utilizações como adubação verde, alimentação humana, nutrição animal, produção de materiais plásticos, desinfetantes, lubrificantes e biodiesel.

A produção mundial de soja no ano agrícola de 2011/2012 foi de 238 milhões de toneladas. A maior produção mundial ficou com os Estados Unidos, que, com uma área cultivada de 29,8 milhões de hectares e 84,1 milhões de toneladas produzidas, foram responsáveis por 35% de toda produção mundial. O Brasil foi o segundo maior produtor neste período, com uma área cultivada de mais de 25

milhões de hectares e cerca de 66 milhões de toneladas produzidas, seguido pela Argentina e China (USDA, 2013).

A soja é produzida na maioria do território brasileiro principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste. A região centro-oeste é a maior produtora (34,9 milhões de toneladas) e o Estado do Mato Grosso, o principal produtor, com uma área cultivada de 6,9 milhões de hectares, com produção de 21,8 milhões de toneladas e participação de 33% na produção nacional (CONAB, 2012).

No Brasil o complexo industrial da soja movimenta cerca de 30 bilhões de dólares e participa com cerca de 20% do Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio nacional e 1,8% do PIB brasileiro (IBGE, 2012). O país é o segundo maior exportador de soja, sendo que comercializa essencialmente soja em grãos ou processada, na forma de farelo ou óleo.

O grande sucesso da produção de soja brasileira deve-se principalmente às pesquisas na área de melhoramento genético e ao desenvolvimento de inúmeras cultivares com características de alto rendimento, adaptabilidade de produção em diferentes ambientes e resistência a pragas e doenças. Além disso, a aplicação da engenharia genética constituiu o grande diferencial para a evolução da produção de soja nos últimos anos. Com a utilização de cultivares comerciais geneticamente modificadas foi possível aumentar a eficiência produtiva, reduzir custos e tornar a atividade mais competitiva e economicamente mais viável, o que provocou um aumento na produção e comercialização desses grãos no Brasil e no mundo (LEITÃO et al., 2010).

2.3 Soja Roundup Ready®

2.3.1 Inserção e utilização do gene CP4-EPSPS

A primeira cultivar de soja transgênica foi registrada pela multinacional Monsanto, nos Estados Unidos, durante a década de 80 e foi também primeiramente comercializada neste país em 1996 (ANTONIOU et al., 2010). A linhagem GTS 40-30-2, mais conhecida como Roundup Ready®, ou soja RR, foi desenvolvida pela

empresa para ser tolerante ao herbicida Roundup®, visando permitir seu uso no controle de plantas daninhas na produção de soja.

A soja RR foi desenvolvida por meio da introdução do gene CP4-EPSPS, que expressa uma forma modificada da enzima EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase) e permite que a planta sobreviva à aplicação do herbicida Roundup® (PADGETTE et al., 1995). O gene foi extraído da bactéria natural do solo *Agrobacterium tumefaciens* estirpe CP4. A obtenção da soja RR ocorreu por meio de transformação genética realizada pelo processo de biobalística, onde as células vegetais foram bombardeadas por partículas contendo os segmentos de DNA (PIONEER, 2006).

Para regular a integração e a expressão do gene bacteriano no genoma da soja foram introduzidos também o gene codificador do peptídeo de direcionamento ao cloroplasto da EPSPS de petúnia (CTP), o promotor CaM35S do vírus do mosaico da couve-flor e uma porção da região 3' terminal não codificadora do gene da nopalina sintase (NOS 3') da *Agrobacterium tumefaciens* (PADGETTE et al., 1995).

O glifosato (N-(fosfometil) glicina, C₃H₈NO₅P), princípio ativo do Roundup®, é um herbicida sistêmico não-seletivo utilizado mundialmente para controlar todos os tipos de plantas invasoras. Esse herbicida age na planta daninha como um inibidor competitivo da enzima EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase), que faz parte da via de biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, essenciais para a sobrevivência e crescimento da maior parte das plantas (CAVALIERI et al., 2012). Quando essa enzima é bloqueada, a via metabólica é interrompida e resulta na supressão do crescimento e conseqüente morte da planta.

A enzima CP4-EPSPS é naturalmente insensível à inibição pelo glifosato, sendo assim, o herbicida não consegue bloqueá-la e as plantas que a expressam desenvolvem-se normalmente (LUTHY, 1999). A soja Roundup Ready® apresenta expressão dupla da enzima EPSPS, uma original da soja, que é desativada com a aplicação do herbicida e a outra CP4-EPSPS, da *Agrobacterium tumefaciens*, que não se deixa afetar. Sendo assim, a linhagem 40-3-2, também referida como evento GTS 40-3-2, é altamente tolerante ao glifosato, não apresentando injúrias após a aplicação do produto (PADGETTE et al., 1995).

A linhagem transgênica obtida (GTS 40-3-2), tolerante ao glifosato, foi cruzada com linhagens convencionais de soja de alto desempenho agrônômico. A partir da segregação esperada 3:1 (tolerante:sensível) na geração F₂, caracterizou-se a herança como qualitativa monogênica com dominância completa (PADGETTE et al., 1995). Desde então, a característica da soja Roundup Ready®, tem sido transferida para diversas cultivares comerciais de soja por meio de melhoramento genético clássico, com destaque para o método de retrocruzamento.

2.3.2 Soja Roundup Ready® vs Soja Convencional

O cultivo da soja, por ser comum em extensas áreas, é tradicionalmente dependente do uso de herbicidas para o controle de plantas daninhas (BARROS et al., 2009). O controle químico é o preferido pelos agricultores, devido às características de economia de mão-de-obra, eficiência e rapidez na aplicação dos produtos. As invasoras prejudicam a cultura, pois competem por luz, água e nutrientes, dificultando a operação de colheita e comprometendo a qualidade dos grãos (MIRANDA, 2005; CORREIA; REZENDE, 2008).

A necessidade do controle das plantas daninhas, na fase inicial de cultivo, faz da cultura da soja um dos maiores segmentos da indústria de herbicidas. O controle de plantas daninhas representa cerca de 15 a 40% do total de insumos utilizados na soja, sendo considerado um importante custo de produção desta cultura (GAZZIERO et al., 1994). Segundo Gazziero e Prete (2004), no cultivo de soja convencional podem ser utilizados cerca de 40 herbicidas e diferentes misturas formuladas.

O cultivo da soja Roundup Ready®, conhecido como economicamente vantajoso, consiste em possibilitar a substituição de vários herbicidas por apenas um, que contenha como ingrediente ativo o glifosato (MELGAREJO, 2006).

O glifosato é um herbicida sistêmico, pós-emergente, classificado como não-seletivo e de ação sistêmica. Apresenta largo espectro de ação, o que possibilita um excelente controle de plantas daninhas anuais ou perenes.

A soja com resistência ao glifosato trouxe novas oportunidades para o controle de plantas daninhas na cultura. A eficiência de controle do glifosato, a facilidade de uso e a flexibilidade de aplicação nos cultivos transgênicos, oferecem vantagem em relação às práticas tradicionais (GAZZIERO; ADEGAS; VOLL, 2007).

No cultivo da soja RR o glifosato pode ser utilizado em aplicações únicas ou seqüenciais, em doses e épocas diferentes, não apresentando sintomas fitotóxicos ou redução de produtividade e qualidade (TREZZI; KRUSE; VIDAL, 2001). Já nos cultivos convencionais, o controle com o glifosato só pode ser feito em pré-plantio ou pré-emergência da cultura, sendo necessária a utilização de outros produtos seletivos para folhas estreitas, no controle em pós-emergência. Caso o herbicida fosse aplicado numa cultura convencional em pós-emergência, o cultivo seria totalmente perdido.

Além disso, o fato do herbicida ser altamente eficaz para controlar a maioria das plantas invasoras em diferentes estágios de desenvolvimento da cultura, possibilita reduções no número de aplicações de insumos químicos e flexibilidade de manejo. Isso pode auxiliar no planejamento de uso de máquinas e implementos na propriedade, representando reduções significativas nos custos por hectare, além de diminuir os impactos ao meio ambiente (BERTAGNOLLI; TILLMANN; VILLELA, 2006).

Menegatti e Barros (2007) analisando os custos com herbicidas nos cultivos convencional e transgênico, observaram que o custo com herbicidas na soja transgênica foi inferior em 52,6%. Por sua vez, o gasto com mão-de-obra foi inferior para a soja transgênica: R\$23,25 / ha contra R\$29,55 / ha. Entretanto, devido à taxa tecnológica agregada à semente transgênica, seu custo torna-se maior.

A redução no número de herbicidas utilizados no controle de plantas daninhas beneficia o meio ambiente, na medida em que reduz o número de aplicações de produto (CARPENTER, 2001). Além disso, o método de cultivo transgênico apresenta alto grau de compatibilidade com o sistema de plantio direto e de cultivo mínimo (CARPENTER, 2001), resultando em menor erosão do solo, melhor qualidade da água e melhor estrutura de solo com teor mais alto de matéria orgânica.

Entre outras vantagens da soja transgênica, vários autores mencionam a simplicidade do controle de plantas daninhas, facilidade de adoção da semeadura direta, melhor aproveitamento da área de cultivo, com aumento da produtividade em razão do melhor controle de plantas daninhas, produção mais homogênea e estável (BONNY, 2003; MONQUERO, 2005; GAZZIERO et al., 2008).

Dados de experimentos de campo, conduzidos anteriormente à comercialização de soja transgênica nos Estados Unidos, indicam que a soja Roundup Ready® não difere significativamente da soja convencional em morfologia, produção de sementes e características agronômicas, tais como tempo de florescimento, conjunto de vagens ou vigor (RE et al., 1993). Além disso, a soja RR foi monitorada quanto à sua suscetibilidade a doenças e insetos e não houve nenhuma diferença significativa observada na severidade da doença ou em infestações por insetos entre as plantas transgênicas e convencionais (RE et al., 1993). Sendo assim, a principal diferença, e que confere as vantagens ao cultivo RR, está apenas no herbicida pós-emergente utilizado nos tratamentos culturais e na quantidade de aplicações efetuadas.

2.3.3 Produção e comercialização de soja Roundup Ready® no Brasil

No Brasil, o cultivo da soja transgênica tem se amplificado frente à convencional principalmente após a aprovação, em março de 2005, da Lei de Biossegurança (11.105 de 24/03/2005), que permitiu a produção e comercialização de cultivares geneticamente modificadas no país (CIB, 2013). Cabe ressaltar que as leis de patentes e de proteção de cultivares foram também determinantes para o sucesso do desenvolvimento e uso de cultivares de soja transgênicas, pois determinaram regras específicas para tratar de questões relacionadas ao melhoramento e à engenharia genética.

Segundo o levantamento da consultoria Céleres (2012), a área plantada com sementes transgênicas no Brasil ocupou na safra 2011/2012, uma área de 21,4 milhões de hectares dos 25 milhões de hectares totais cultivados com esta oleaginosa. Isso representa mais de 85% da área cultivada com soja transgênica. De acordo com o levantamento, o plantio de soja transgênica deverá atingir 24,36 milhões de hectares na safra 2012/2013, ou quase 90% da área total semeada com soja.

A utilização da tecnologia Roundup Ready® continua crescendo entre os produtores e vem também sendo o caráter de maior oferta pelas instituições de pesquisa, por meio de novas cultivares. Atualmente, são 466 cultivares

geneticamente modificadas registradas com o evento GTS 40-3-2 junto ao Registro Nacional de Cultivares (RNC) até fevereiro de 2013 (MAPA, 2013).

As empresas de melhoramento genético, públicas e privadas, incorporaram a característica RR em suas linhagens elite de soja (LEITÃO et al., 2010). A maior parte dessas linhagens são cultivares melhoradas, portadoras de genes capazes de expressar alta produtividade, ampla adaptação e boa tolerância a fatores bióticos ou abióticos. Apesar do grande número de cultivares existente, estudos sobre a variabilidade genética têm destacado que o germoplasma brasileiro possui uma base genética estreita (HIROMOTO; VELLO, 1986; PRIOLLI et al., 2002; PRIOLLI et al., 2004; WYSMIERSKI, 2010).

2.4 Estudo da base genética

O melhoramento genético foi a principal ferramenta que contribuiu para aprimorar as características importantes das cultivares de soja brasileiras, tais como alta produtividade de grãos e adaptação a diferentes condições edafoclimáticas. No entanto, o uso de poucos genitores no início dos programas de melhoramento ocasionaram uma perda considerável da variabilidade genética originalmente disponível, levando ao estreitamento da base genética.

Hiramoto e Vello (1986) estudaram a base genética de 74 cultivares de soja recomendadas para o Brasil no ano agrícola de 1983/1984 e observaram que as cultivares eram derivadas de 26 ancestrais, sendo que deste total, apenas 11 eram responsáveis por 89% daquele conjunto gênico, indicando que a soja brasileira possuía uma base muito estreita. Em estudos com 90 cultivares elites adaptadas a diferentes ambientes brasileiros, Miranda et al. (2007) reportaram que o tamanho efetivo da base genética é reduzido sustentando assim, a existência de alto grau de similaridade entre as cultivares brasileiras.

Wysmierski (2010) ao avaliar as genealogias de 444 cultivares brasileiras, encontraram 60 ancestrais sendo que destes apenas 14 contribuíram com mais de 90% da base genética das cultivares. O estudo avaliou a evolução da base genética por períodos de lançamento e revelou também que houve aumento do número de ancestrais ao longo dos anos. Entretanto, quatro principais ancestrais foram os mesmos em todos os períodos de lançamento e sua contribuição ficou mais

concentrada, passando de 46,60% antes de 1971 para 57,59% no período de 2001 a 2009, indicando que a base genética atual da soja brasileira continua bastante estreita.

Priolli et al. (2002, 2004) e Bonato et al. (2006) analisaram cultivares brasileiras de soja utilizando marcadores moleculares e verificaram também que as cultivares são oriundas de um limitado número de ancestrais.

A base genética estreita é a principal limitação para os programas de melhoramento, ocasionando reduzida variabilidade e fornecendo riscos de vulnerabilidade genética (MARTIN, 2000; FU, 2006). Essa vulnerabilidade ocorre quando uma cultivar amplamente cultivada se torna uniforme, suscetível a uma doença, praga ou condição climática, resultante de sua constituição genética restrita, criando potencial para extensa perda do cultivo (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011).

2.5 Diversidade genética

Estudos sobre a diversidade genética têm sido de grande importância para fins de melhoramento genético e para avaliar o impacto da atividade humana na biodiversidade. São igualmente importantes no entendimento dos mecanismos evolutivos que atuam na diversificação das espécies, bem como no entendimento de como as populações naturais se estruturam no tempo e no espaço e as suas chances de sobrevivência ou extinção (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011). O estudo da diversidade genética é valioso para a utilização, conservação e gerenciamento dos recursos genéticos de uma espécie.

A existência de variabilidade genética é uma forma de manter a capacidade natural das espécies de responder a mudanças climáticas e a todos os tipos de estresses bióticos e abióticos e assegurar a base para ganhos genéticos (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011). Atualmente existe grande preocupação em avaliar a diversidade genética das espécies, em razão da perda acentuada dessa variabilidade, de forma que grandes extensões de área estão sendo ocupadas por cultivares altamente semelhantes.

No melhoramento genético de plantas, o uso da divergência genética é fundamental, pois permite ampliar a base genética de uma cultura (CUI et al., 2001).

Além disso, é utilizada para identificar combinações híbridas superiores aos progenitores, identificar conjuntos gênicos mais amplos e a disponibilidade de cruzamentos.

Existem duas maneiras básicas de inferir sobre a diversidade genética, sendo a primeira de natureza quantitativa e a outra de natureza preditiva. Dentre esses dois métodos de avaliação da diversidade, os métodos preditivos recebem maior atenção, pois dispensam a obtenção prévia das combinações híbridas (CRUZ; REGAZZI, 2001). Esses métodos são alternativos viáveis e têm por base as diferenças morfológicas, fisiológicas, agronômicas e moleculares, quantificadas em alguma medida de dissimilaridade que é avaliada por meio de técnicas de análises multivariadas que permite expressar o grau de diversidade genética entre os genótipos (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2004).

Métodos preditivos têm sido utilizados em estudos de diversidade genética em soja com o intuito de selecionar genótipos divergentes para a formação de híbridos superiores (ALMEIDA; PELUZIO; AFFÉRI, 2011; RIGON et al., 2012), fornecer informações sobre acessos para aumento da base genética dos programas de melhoramento de soja (MULATO; 2010, LIU et al., 2011) e detectar diversidade genética existente em grupos de genótipos específicos (PRIOLLI et al., 2010; DORNELES et al., 2011; SALIMI et al., 2012).

2.6 Técnicas de análises multivariadas na avaliação da diversidade genética

2.6.1 Análise de agrupamento

No estudo de diversidade genética as técnicas de análises multivariadas mostram-se eficientes em fornecer informações sobre a variabilidade genética de várias culturas, como feijão (BERTINI et al., 2010), arroz (BENITEZ et al., 2011), milho (DOTTO et al., 2010), seringueira (GOUVÊA et al., 2010) e soja (SALIMI et al., 2012). Essas técnicas constituem-se em ferramentas de grande utilidade, por conseguir unificar múltiplas informações de um conjunto de caracteres de interesse no melhoramento genético (CRUZ; REGAZZI, 2001; FONSECA et al., 2006). Dentre as técnicas multivariadas, as mais empregadas na predição da divergência genética são os métodos de agrupamento e as análises por componentes principais e

variáveis canônicas. A escolha do método mais adequado tem sido determinada de acordo com os objetivos do pesquisador, pela facilidade de análise e pelas informações disponíveis, sejam elas características morfológicas, agronômicas ou moleculares (DINIZ FILHO, 2000).

A análise de agrupamento é uma técnica que tem por objetivo identificar grupos de indivíduos com características similares em relação às variáveis observadas. A técnica é realizada após a estimação de uma matriz de distância ou dissimilaridade, e com base nessa matriz identificam-se os grupos pela similaridade dos indivíduos, de forma a obter homogeneidade dentro e heterogeneidade entre os grupos formados (CRUZ, 2008).

Entre os métodos de agrupamento mais empregados pelos melhoristas de plantas destacam-se os hierárquicos e os de otimização. Nos métodos hierárquicos os indivíduos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis, até que seja estabelecido um dendrograma, não havendo preocupação com o número ótimo de grupos. Entre os mais utilizados estão o método de ligação simples (single linkage), ligação completa (“complete linkage”) e ligação média entre grupos (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean – UPGMA”). Nos métodos de otimização, por sua vez, a alocação dos indivíduos tem como objetivo formar grupos mutuamente exclusivos e dentre estes se destaca o método de otimização proposto por Tocher (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011).

Basicamente, a utilização dos métodos de agrupamento requer medidas de distância ou dissimilaridade (CRUZ et al., 2006). A escolha de uma ou de outra é feita subjetivamente levando em consideração fatores como a natureza das variáveis. Para variáveis quantitativas são frequentemente utilizadas as medidas obtidas pela distância generalizada de Mahalanobis e pela distância Euclidiana, distância Euclidiana média e quadrado da distância Euclidiana. Para o cálculo das medidas de similaridade, geralmente recomendadas para caracteres binários ou para análises com marcadores moleculares, podem ser utilizados os coeficientes de coincidência simples, Jaccard, Rogers e Tanimoto, entre outros (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011).

Análises de agrupamento tem sido utilizadas com frequência para estimar a diversidade genética em soja a partir de características agronômicas quantitativas

(PELUZIO et al., 2009; LIU et al., 2011; RIGON et al., 2012) e moleculares (MALIK et al., 2009; PRIOLLI et al., 2010; TANTASAWAT et al., 2011).

2.6.2 Análise por componentes principais

A análise por componentes principais consiste em transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis de dimensão equivalente denominadas de componentes principais. Estes, apresentam propriedades importantes: cada componente é uma combinação linear de todas as variáveis originais, são independentes entre si e estimados com propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo de informação, em termos de variação total contida nos dados iniciais (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011). A importância de cada componente principal é dada pela porcentagem de variância total que ele absorve (DIAS, 1994).

A técnica de componentes principais é representada por uma dispersão gráfica, que possibilita visualizar as proximidades entre os indivíduos e os vínculos entre as variáveis. Pela dispersão gráfica dos componentes principais o padrão de similaridade dos indivíduos pode ser conferido, recuperando-se a informação ao nível de indivíduo que é perdida por se considerar apenas a informação de grupos nas análises de agrupamento (DIAS; KAGEYAMA; CASTRO, 1997). Nos casos em que os primeiros componentes comportam uma porcentagem relativamente alta da variação total, acima de 80%, a variabilidade entre os indivíduos avaliados pode ser explicada satisfatoriamente (CRUZ, 2006).

O emprego da técnica dos componentes principais para estudos sobre divergência genética em plantas tem sido realizado com o propósito de avaliar a dissimilaridade entre genótipos, identificar parentais divergentes para hibridação e estimar a variabilidade total disponível em grupos geneticamente relacionados. Além disso, a análise permite inferir sobre quais os caracteres responsáveis pela maior parte da divergência encontrada, possibilitando o descarte de caracteres que pouco contribuem para a divergência genética dos genótipos em estudo, reduzindo significativamente o tempo e o custo de avaliação destas características (CRUZ, 2008).

A análise por variáveis canônicas assemelha-se à de componentes principais, pois permite a simplificação de um conjunto de dados, resumindo as informações em poucas variáveis. Entretanto, essa técnica baseia-se nas informações entre e dentro de genótipos havendo necessidade de dados, em nível de acessos, com repetições. Já a técnica de componentes principais baseia-se apenas nas informações individuais de cada acesso, sem a necessidade de dados com repetições (CRUZ; 2006).

2.7 Diversidade com base em caracteres fenotípicos

O estudo da diversidade genética por meio de caracteres agronômicos ou fenotípicos, principalmente os de natureza quantitativa, é de interesse no melhoramento aplicado, tendo em vista sua importância econômica e a necessidade de se obter êxito na escolha adequada de combinações híbridas superiores.

Dias (1994) explica que a seleção de genitores baseada em vários caracteres importantes pode ser mais vantajosa que aquela baseada em caracteres individuais, principalmente quando efetuada em um grupo de caracteres quantitativos complexos, como produção de grãos. No manuseio simultâneo de vários caracteres fenotípicos, as técnicas multivariadas a exemplo das análises de agrupamento e análise de componentes principais, são opções vantajosas na otimização do uso ou da avaliação de germoplasma e na predição de combinações heteróticas, onde centenas de cruzamentos indesejáveis podem ser evitados.

Diversos trabalhos que visam estimar a divergência genética em soja vêm sendo realizados utilizando-se análises multivariadas baseadas em dados fenotípicos. Peluzio et al. (2009), utilizando os caracteres altura das plantas, altura da inserção da primeira vagem, número de dias para florescimento, número de dias para maturidade, número de vagens por planta, número de sementes por vagem, peso de 100 sementes e produtividade de grãos encontraram dissimilaridade entre 14 cultivares de soja, sob diferentes condições edafoclimáticas. Liu et al. (2011), observaram que 9 caracteres agronômicos foram suficientes para diferenciar 91 linhagens de soja, alocando-as em dois grupos distintos, os quais correspondiam às suas origens geográficas. Santos et al. (2011) estimaram a diversidade genética entre 48 genótipos de soja, utilizando 17 caracteres fenotípicos, e conseguiram

identificar hibridações promissoras visando maior produção de grãos. Almeida, Peluzio e Aféri (2011) utilizaram 8 caracteres agrônômicos para promover o agrupamento de cultivares, em função da dissimilaridade genética, e facilitar a escolha de genitores mais divergentes. Rigon et al. (2012) avaliaram 18 cultivares de soja por meio de caracteres quantitativos e observaram que as variáveis de maior contribuição para a divergência genética foram a altura de inserção da primeira vagem e o número de dias para a maturação fisiológica.

Embora os caracteres fenotípicos sejam tradicionalmente utilizados para estimar a diversidade genética, eles são de importância limitada, uma vez que são geralmente influenciados pelo ambiente e estágio de desenvolvimento da planta, e porque, em algumas espécies, adequado nível de polimorfismo fenotípico não está disponível (TATIENI et al., 1996). Desta forma, os marcadores moleculares são ferramentas úteis para detectar polimorfismos na sequência de DNA das plantas e são pouco influenciados pelo ambiente, sendo adequados para estimação da divergência genética por técnicas multivariadas (FRANCO et al., 2001).

A utilização de caracteres fenotípicos e de marcadores moleculares pode fornecer uma visão mais completa acerca da diversidade genética dos materiais. Singh et al. (1991) relataram que a melhor forma de se identificar divergência entre genótipos é o uso combinado de marcadores moleculares e caracteres agromorfológicos, promovendo um complemento nos resultados.

2.8 Diversidade com base em marcadores moleculares

Atualmente os marcadores moleculares têm sido uma das principais ferramentas utilizadas na análise de diversidade genética. Com esta tecnologia tornou-se possível acessar o genótipo das espécies e detectar polimorfismos ao nível de DNA, suficientes para discriminar a variação genética entre indivíduos e dentro de populações (CAIXETA et al., 2009).

Os marcadores de DNA são estáveis, em relação à influência ambiental, podem ser utilizados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta e são em geral muito polimórficos, quando comparados aos caracteres fenotípicos. Nesse sentido, eles são capazes de fornecer excelentes resultados na caracterização da diversidade genética de germoplasmas em programas de melhoramento, na

predição da heterose, na busca por grupos heteróticos promissores para constituição de híbridos, na avaliação de fluxo gênico e na identificação de duplicatas nos bancos de germoplasma (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011).

Existe atualmente diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível do DNA. Vários deles já foram utilizados para detectar polimorfismo em soja, tais como RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) (KEIM et al., 1992), AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) (BONATO et al., 2006) e RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), (LI et al., 2008), mas quando comparados com o SSR (“Simple Sequence Repeat”), este último claramente detecta um nível mais elevado de polimorfismo em populações divergentes, podendo até distinguir cultivares com genealogia semelhante (DOLDI et al., 1997; PRIOLLI et al., 2002; SINGH et al., 2010).

2.9 Marcadores moleculares microssatélites

Os marcadores moleculares microssatélites ou SSR (“Simple Sequence Repeats”) são sequências simples, constituídas de um a seis nucleotídeos, que se repetem em tandem e são encontrados em alta frequência e ampla distribuição nos genomas eucariotos (CAIXETA et al., 2009). O tipo de repetição (mono, di, tetra, penta e hexanucleotídeos) e a frequência dos motivos são variáveis entre diferentes táxons (KATTI et al., 2001). Os microssatélites são encontrados em regiões codantes e não codantes do genoma (ZANE et al., 2002).

As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a utilização de iniciadores específicos que amplificam via PCR (“Polimerase Chain Reaction”) o DNA repetitivo (CAIXETA et al., 2009). Cada microssatélite constitui um loco genético altamente polimórfico, cujas variações no número de repetições determinam diferentes alelos no perfil de cada indivíduo. Essa variação no número de repetições pode ser originado por “crossing-over” desigual ou deslize da DNA polimerase durante a replicação (“slippage”) (OLIVEIRA et al., 2006).

Os marcadores SSR caracterizam-se por serem co-dominantes, multialélicos e de distribuição frequente e aleatória, permitindo ampla cobertura do genoma (BORÉM; CAIXETA, 2006). Além disso, são baseados em PCR, o que torna seu uso

prático, mesmo com poucas quantidades de DNA, possuem alta reprodutibilidade e apresentam alto conteúdo informativo por loco (FERREIRA; GRATTAPLAGLIA, 1998).

Todas essas características fazem desses marcadores ferramentas eficientes não apenas para estudos de diversidade genética, mas também para construção de mapas genômicos, distinção e proteção de variedades, avaliação de pureza de sementes, utilização e conservação de germoplasma, análise gênica e de locos quantitativos (QTL), análise de “pedigree”, seleção assistida por marcadores e análise de biblioteca para clonagem de genes (CAIXETA et al., 2009).

O alto nível de variação detectado com os marcadores SSR aumenta a resolução do estudo de genealogia e diversidade genética e reduz o número de marcadores requeridos para distinguir genótipos. Em soja mais de 600 SSRs foram desenvolvidos e mapeados, estando distribuídos em todos os grupos de ligação (CREGAN et al., 1999), o que possibilita ampla varredura de todo o genoma da espécie. Com isso, os microssatélites têm sido amplamente empregados na estimação da diversidade genética em germoplasmas de soja (ALCÂNTARA NETO, 2001; PRIOLLI et al., 2004; WANG et al., 2006, LI et al., 2008, PRIOLLI et al., 2010; LIU et al., 2011).

Priolli et al. (2002) utilizando 12 locos microssatélites puderam distinguir 186 cultivares de soja brasileiras e encontrar o ancestral para 98% delas. Os dados observados por um dendrograma gerado pelo método UPGMA foi compatível com as genealogias das cultivares.

Yamanaka et al. (2007) estudaram a relação entre cultivares chinesas, japonesas e brasileiras utilizando 12 marcadores microssatélites. Eles descobriram, a partir dos resultados obtidos pelo agrupamento UPGMA, que o germoplasma brasileiro estudado era mais distante do chinês e japonês do que estes eram entre si.

Utilizando 53 marcadores SSR, Vieira et al. (2009) detectaram significativa variabilidade entre 53 cultivares brasileiras de soja. A partir dos resultados os autores concluíram que ainda existe bastante variabilidade genética no germoplasma brasileiro a ser explorada pelos programas de melhoramento.

Mulato et al. (2010) avaliando 79 acessos de soja de diferentes regiões do mundo encontraram alta diversidade genética entre os acessos utilizando 30 iniciadores SSR. Os autores afirmam que a diversidade genética em soja pode ser efetivamente investigada utilizando marcadores microssatélites, pois estes permitem uma cobertura completa da variação genética existente no germoplasma.

Avaliando a similaridade entre 25 cultivares de soja tailandesas por meio de 11 microssatélites, Tantasawat et al. (2011) encontraram baixa diversidade genética entre as linhagens e destacaram a necessidade de ampliação da base genética do germoplasma tailandês.

Informações sobre a diversidade genética de soja contribuem para o entendimento das limitações inerentes a base genética estreita de materiais de programas de melhoramento. Além disso, o monitoramento da variabilidade genética dentro de um grupo de cultivares elites, como o de soja RR, pode direcionar os programas de melhoramento para o desenvolvimento de cultivares superiores (SINGH et al., 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material genético

Um grupo de 74 cultivares de soja RR desenvolvidas por empresas públicas e privadas de melhoramento, adaptadas para cultivo em diversas regiões do Brasil, foram utilizadas para representar as cultivares RR comercializadas no país a partir do ano de 2005 (Tabela 1). Cada cultivar recebeu uma numeração de 1 a 74, utilizada para identificação das mesmas durante as etapas de trabalho.

3.2 Instalação do experimento em campo

O experimento de campo foi instalado no ano agrícola 2011/2012 na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV-UNESP) localizada no município de Jaboticabal, SP, cujas coordenadas geográficas são 21°19' S e 47°33' W, a altitude é de 616 m e o solo é do tipo Latossolo Vermelho Eutroférico.

Tabela 1. 74 cultivares de soja RR estudadas e os respectivos programas de melhoramento genético que as desenvolveram

AGROESTE	18. BRS246 RR	38. M7578 RR	58. P98Y01 RR
1. AS7307 RR	19. BRS278 RR	39. M7639 RR	SOY TECH SEEDS
2. AS8380 RR	20. BRS279 RR	40. M7908 RR	59. STS810 RR
BRASMAX	21. BRS8160 RR	41. M8230 RR	60. STS820 RR
3. BMX Apolo RR	22. BRS8460 RR	42. M8336 RR	SYNGENTA
4. BMX Energia RR	23. BRSMG740S RR	43. M8360 RR	61. NK7074 RR
5. BMX Força RR	24. BRSMG750S RR	44. M8527 RR	62. SYN9074 RR
6. BMX Impacto RR	25. BRSMG760S RR	45. M8766 RR	63. SYN9078 RR
7. BMX Magna RR	26. BRSMG850G RR	46. M9144 RR	TMG
8. BMX Potência RR	27. BRSMG811C RR	47. MSOY7878 RR	64. ANTA82 RR
9. BMX Titan RR	28. BRS Baliza RR	NIDERA	65. TMG103 RR
COODETEC	29. BRS Charrua RR	48. A4910 RR	66. TMG106 RR
10. CD214 RR	30. BRS Favorita RR	49. A6411 RR	67. TMG108 RR
11. CD219 RR	31. BRS Juliana RR	50. NA7255 RR	68. TMG115 RR
12. CD230 RR	32. BRS Pampa RR	51. NA8015 RR	69. TMG123 RR
13. CD242 RR	33. BRS Silvânia RR	PIONEER	70. TMG132 RR
14. CD243 RR	34. BRS Valiosa RR	52. P98Y11 RR	71. TMG1179 RR
EMGOPA/EMATER - GO	FT SEMENTES	53. P98Y12 RR	72. TMG1182 RR
15. EMGOPA315 RR	35. FTS Jaciara RR	54. P98Y30 RR	73. TMG4001 RR
EMBRAPA	MONSANTO	55. P98Y51 RR	74. TMG7188 RR
16. BRS243 RR	36. GB874 RR	56. P98Y70 RR	
17. BRS244 RR	37. M7211 RR	57. P98Y31 RR	

O experimento foi conduzido em área homogênea e cada parcela foi constituída de fileira única de 5 m de comprimento, com espaçamento de 0,5 m entre linhas. Esta estratégia foi adotada em função do pequeno número de sementes disponíveis e de acordo com a metodologia utilizada para bancos de germoplasma, onde se tem um grande número de acessos para avaliação, e portanto, os mesmos são dispostos em fileiras simples, sem repetições (CARVALHO et al., 2003; CHIORATO et al., 2007). Foi considerada como área útil, apenas os 4,0 m centrais da linha, sendo descartados 0,5 m de cada extremidade. A densidade de semeadura foi de aproximadamente 25 sementes por metro linear. Foram realizados todos os tratos culturais recomendados para a cultura (Embrapa, 2011).

3.3 Caracteres agrônômicos

Durante o desenvolvimento da planta e posteriormente à colheita foram avaliados os seguintes caracteres agrônômicos:

1) Número de dias para o florescimento (NDF): número de dias contados a partir da data de emergência das plântulas até a ocorrência de 50% de florescimento das plantas, na parcela (estágio R2);

2) Número de dias para maturidade (NDM): número de dias contados a partir da data de emergência das plântulas até a data em que 95% das vagens das plantas da parcela apresentaram-se maduras (estágio R8);

3) Altura de inserção da primeira vagem (AIV): distância, medida em cm, desde a superfície do solo até a inserção da primeira vagem na haste principal;

4) Altura da planta na maturidade (APM): distância, medida em cm, desde a superfície do solo até o último nó da haste principal;

5) Acamamento (AC): caráter obtido por uma escala de notas visuais, variando de 1 (todas as plantas da parcela estão eretas) a 5 (todas as plantas da parcela estão acamadas);

6) Valor agrônômico (VA): caráter avaliado em uma escala de notas visuais, variando de 1 (parcela com plantas de baixo valor experimental) a 5 (parcela com plantas de excelente valor experimental), sendo a nota representativa de um conjunto de caracteres visuais adaptativos, tais como arquitetura da planta, quantidade de vagens cheias, vigor, sanidade da planta, debulha prematura das vagens, acamamento e retenção foliar na maturidade;

7) Número de ramos (NR): contagem realizada após a colheita correspondendo ao número de ramos produzidos pela haste principal da planta;

8) Número de vagens por planta (NVP): contagem realizada após a colheita correspondendo ao número de vagens produzidas pela planta;

9) Peso de 100 sementes (PCS): peso, em gramas, obtido de uma amostra de 100 sementes após a debulha das vagens;

10) Produção de grãos (PG): peso, em gramas, das sementes colhidas, após a debulha das vagens.

Os caracteres agrônômicos foram avaliados utilizando-se dados médios de 6 plantas escolhidas ao acaso dentro da parcela.

3.4 Análise da diversidade fenotípica com base em caracteres agronômicos

Para as análises multivariadas realizadas a partir dos dez caracteres agronômicos, foram utilizados os métodos: distância Euclidiana, agrupamento pelo método de otimização de Tocher, agrupamento pelo método hierárquico da ligação média entre grupos (UPGMA) e análise por componentes principais. A distância Euclidiana foi a medida de dissimilaridade escolhida, por não exigir experimentos que envolvam delineamentos com repetições.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2006; 2008). A construção do dendrograma UPGMA foi realizada utilizando-se o programa Statistica (STATSOFT, 2004). A descrição das análises abaixo é apresentada conforme Cruz (2008).

3.4.1 Distância Euclidiana (d_{ij})

O cálculo da distância Euclidiana foi feito a partir dos dados originais padronizados, em virtude das diferentes escalas de mensuração. Para a padronização utilizou-se a expressão:

$$y_{ij} = \frac{Y_{ij}}{S(Y_j)}$$

em que:

Y_{ij} : média original obtida no descritor j da cultivar i ;

$S(Y_j)$: desvio padrão do descritor j .

Após a padronização a distância Euclidiana entre os pares de cultivares foi calculada utilizando-se a expressão:

$$d_{ij} = \sqrt{\sum_j (y_{ij} - y_{rj})^2}$$

em que:

y_{ij} : observação na i -ésima cultivar ($i = 1, 2, \dots, p$), em relação ao j -ésimo caráter ($j = 1, 2, \dots, n$) estudado.

3.4.2 ANÁLISES DE AGRUPAMENTO

Após os cálculos da distância Euclidiana uma matriz de distâncias entre as cultivares foi gerada e a partir desta matriz realizaram-se os agrupamentos pelo método de Tocher e pelo método UPGMA.

No método de otimização de Tocher, sobre a matriz de distâncias é identificado o par de indivíduos mais similares, que formarão o grupo inicial. A partir daí é avaliada a possibilidade de inclusão de novos indivíduos no grupo, adotando-se o critério que, com a inclusão de novos indivíduos, a distância média intragrupo deve ser menor que a distância média intergrupo. Assim, pode-se tomar a decisão de incluir o indivíduo em um grupo por meio da comparação entre o acréscimo no valor médio da distância dentro do grupo e um nível máximo permitido, que será o valor máximo (θ) da medida de dissimilaridade encontrada no conjunto das menores distâncias envolvendo cada indivíduo. Uma vez formado o primeiro grupo, calculam-se as medidas de dissimilaridade entre esse e os demais genótipos pela expressão:

$$d_{(ij)k} = d_{ik} + d_{jk}$$

em que:

$d_{(ij)k}$: medida de dissimilaridade entre o grupo ij e o genótipo k;

d_{ik} : medida de dissimilaridade entre os genótipos i e k;

d_{jk} : medida de dissimilaridade entre os genótipos j e k.

A inclusão, ou não, do indivíduo k no grupo ij é, então feita considerando:

$$\frac{d_{(grupo)k}}{n} \leq \theta, \text{ inclui-se o indivíduo k no grupo;}$$

$$\frac{d_{(grupo)k}}{n} > \theta, \text{ o indivíduo k não é incluído no grupo.}$$

em que:

n: número de indivíduos que constitui o grupo original.

O método da ligação média entre grupos (UPGMA), utiliza as médias aritméticas (não ponderadas) das medidas de distância, evitando caracterizar a distância por valores extremos (mínimo e máximo) entre os indivíduos considerados. A construção do dendrograma é estabelecida pelos indivíduos de maior similaridade e a distância entre um indivíduo k e um grupo formado é fornecida por:

$$d_{(ij)k} = \frac{d_{ik} + d_{jk}}{2}$$

3.4.3 Análise por componentes principais

A análise por componentes principais permiti visualizar a dispersão das cultivares a partir de um plano cartesiano, obtido pelos scores dos primeiros componentes, nos quais o aproveitamento da variabilidade disponível seja maximizado. Para a realização da análise, feita com dados padronizados, considera-se que X_{ij} é a média padronizada do j -ésimo caráter ($j = 1, 2, \dots, n$) avaliado no i -ésimo genótipo ($i = 1, 2, \dots, g$) e R a matriz de covariâncias ou de correlação fenotípica entre esses caracteres.

A técnica dos componentes principais consiste em transformar o conjunto de variáveis quantitativas iniciais ($x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{iv}$) em um novo conjunto ($Y_{i1}, Y_{i2}, \dots, Y_{iv}$), que são funções lineares dos x_i 's e independentes entre si, denominadas de componentes principais. Cada componente principal (Y_{ij}) representa uma combinação linear de variáveis do primeiro conjunto, de tal forma que não haja correlação entre estes novos componentes. Na análise, o primeiro componente é o de maior variância, seguido pelo segundo de maior variância, e assim sucessivamente para os demais componentes.

A técnica baseia-se apenas nas informações individuais de cada acesso sendo indicada quando o delineamento não possui repetições, como é o caso deste trabalho.

3.5 Análises moleculares

As análises moleculares foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas, do Departamento de Produção Vegetal, da

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV-UNESP) de Jaboticabal, SP.

3.5.1 Coleta do tecido vegetal e extração de DNA

Foram coletados trifólios jovens de cada uma das 74 cultivares de soja RR avaliadas. Na seqüência, os trifólios foram levados ao laboratório e armazenados em freezer a -80°C.

As amostras coletadas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e o pó resultante foi submetido à extração de DNA. O DNA genômico foi extraído seguindo a metodologia descrita por Ferreira e Grattapaglia (1998), que utiliza o tampão de extração CTAB. A integridade do DNA extraído foi observada em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. Em seguida, a concentração do DNA foi estimada por espectrofotometria mediante leitura da densidade ótica a 260 e 280 nm. Após terem suas concentrações estimadas, as amostras de DNA foram diluídas em TE em uma concentração de 10 ng/μL e estocadas à -20°C.

3.5.2 Iniciadores microssatélites

A partir das informações contidas no mapa genético da soja, disponível na base de dados pública (www.soybase.org), foram selecionados 100 pares de iniciadores microssatélites que flanqueiam regiões repetitivas dispersas no genoma da espécie. Os iniciadores foram escolhidos com base em sua distribuição pelos grupos de ligação da soja e pelos seus valores de PIC ("Polymorphism Information Content"), apresentados em estudos prévios (CREGAN et al., 1999). Os 100 SSRs escolhidos cobrem todos os 20 grupos de ligação, possibilitando uma cobertura de todo o genoma da soja e conseqüentemente uma eficiente caracterização da diversidade genética no grupo de cultivares RR.

As seqüências dos iniciadores (senso e anti-senso) de cada loco microssatélite foram descritas por Song (2004).

3.5.3 Reação de amplificação

As reações de amplificação por PCR foram realizadas para cada uma das 74 cultivares, utilizando os 100 iniciadores SSRs escolhidos. As reações foram completadas para o volume final de 25 μL, contendo 12 ng de DNA genômico, 4 mM

MgCl₂, tampão PCR 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0), 200 µM de dNTP's (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1 U Taq DNA polimerase e 10 µM de cada iniciador (senso e anti-senso). Para cada par de iniciador SSR foi calculado uma temperatura específica de anelamento (T_a).

O programa de termociclagem foi composto por um ciclo inicial de desnaturação de 7 min a 94°C, seguido por 32 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min na temperatura de anelamento específica de cada par de iniciador e 2 min de extensão a 72°C, finalizando com uma extensão final de 7 min a 72°C e mantendo-se, posteriormente, à temperatura de 4°C. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador Bio-Rad (C1000 Thermal Cycler).

3.5.4 Visualização dos resultados e análise do polimorfismo

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em géis de agarose 3%, em tampão TBE 1X (89 mM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,0) e corados com brometo de etídeo na concentração de 10 mg ml⁻¹. A eletroforese foi conduzida a 110 V, 400 mA por aproximadamente 3 horas. A visualização dos fragmentos foi feita em fotodocumentador Biosystems Quantum ST4. A variação do tamanho de cada loco foi estimada por meio de comparação com um marcador de tamanho 100 pb. Fragmentos de diferentes tamanhos foram considerados como diferentes alelos. A partir dos fragmentos observados nos géis, foi organizada uma matriz binária baseada na presença (1) ou ausência (0) de marcas (bandas) para cada alelo encontrado.

3.6 Análise da diversidade genética com base em marcadores SSRs

Os SSRs foram analisados pelo número de alelos por loco, pela frequência alélica por loco e pelo conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada loco SSR avaliado. O PIC representa a diversidade gênica para um dado loco, considerando o número de alelos expressos e também as frequências relativas destes alelos. Segundo Botstein et al. (1980) o PIC é um indicador da qualidade do marcador em estudos genéticos, onde, marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, e com valores inferiores a 0,25, pouco informativos.

O PIC para cada loco SSR foi calculado utilizando-se a fórmula:

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

em que:

P_{ij} : frequência do i-ésimo alelo para uma dada marca, somado ao longo dos n alelos.

As distâncias genéticas para os dados moleculares foram calculadas a partir do coeficiente de Jaccard utilizando-se o programa Genes (CRUZ, 2008). As medidas de similaridade (S_{ij}) entre cada par de cultivares foram obtidas utilizando-se a expressão:

$$S_{ij} = \frac{a}{a+b+c}$$

em que:

a: número de concordâncias do tipo 1-1;

b: número de discordâncias do tipo 1-0;

c: número de discordâncias 0-1.

As medidas de similaridade foram convertidas em dissimilaridade por meio do complemento aritmético (d_{ij}), sendo: $d_{ij} = 1 - S_{ij}$.

As medidas de dissimilaridade foram utilizadas para o agrupamento das cultivares pelo método hierárquico da ligação média entre grupos (UPGMA), com auxílio do programa Statistica (STATSOFT, 2004). Por esse método, as cultivares foram agrupadas por um processo que se repete em níveis, até o estabelecimento de um dendrograma. A estabilidade dos agrupamentos foi testada pelo procedimento de re-amostragem com 10.000 repetições ("Bootstrap") sendo utilizado o programa BooD (COELHO, 2002).

3.7 Correlação entre medidas de dissimilaridade obtidas a partir de dados fenotípicos e moleculares

As matrizes de dissimilaridade obtidas a partir da distância Euclidiana e do coeficiente de Jaccard foram correlacionadas pelo programa Genes (CRUZ, 2008), sendo a significância avaliada pelo Teste t e Teste de Mantel com 10.000 simulações.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Diversidade fenotípica com base em caracteres agronômicos

As distâncias genéticas entre cultivares obtidas por meio dos caracteres agronômicos e estimadas a partir da distância Euclidiana (d_{ij}), oscilaram entre 0,46 a 9,79, indicando a presença de variabilidade genética entre as cultivares de soja RR.

Na matriz de dissimilaridade foram identificados os 15 pares de cultivares mais divergentes (Tabela 2). A distância Euclidiana máxima ($d_{ij} = 9,79$) foi obtida entre o par de cultivares BRS Juliana (31) e A6411 (49), além disso, dentre as maiores distâncias encontradas a cultivar BRS Juliana (31) esteve presente na maioria das combinações. Sabe-se que, quanto maior a distância calculada, maior a divergência entre os indivíduos. A distância mínima ($d_{ij} = 0,46$) foi encontrada entre a cultivar BMX Apolo (3) e BMX Energia (4), ambas pertencentes ao mesmo programa de melhoramento (Brasmax). Os 15 pares de cultivares mais similares encontrados na matriz de dissimilaridade estão listadas na Tabela 3.

A diversidade dentro dos programas de melhoramento foi avaliada entre aqueles que continham a partir de cinco cultivares, como foi o caso do programa Brasmax (7 cultivares avaliadas), Coodetec (5), Embrapa (19), Monsanto (12), Pioneer (7) e TMG (11). A partir da matriz de dissimilaridade foram identificadas as máximas e mínimas distâncias encontradas entre cultivares dentro de seus respectivos programas de melhoramento (Tabela 4). O programa Brasmax apresentou a menor distância entre cultivares ($d_{ij} = 0,46$) entre todas as mínimas distâncias observadas. Além disso, também apresentou a menor distância ($d_{ij} = 3,35$) quando observadas as máximas distâncias entre cultivares dentro dos programas.

Tabela 2. Quinze pares de cultivares mais divergentes estimados a partir da distância Euclidiana no estudo de divergência fenotípica entre 74 cultivares de soja RR

Ordem	Distância Euclidiana	Pares de cultivares
1 ^o	9,79	31-49
2 ^o	9,73	6-31
3 ^o	9,71	4-31
4 ^o	9,64	3-31
5 ^o	9,38	8-31
6 ^o	9,34	48-31
7 ^o	9,14	14-40
8 ^o	9,08	45-49
9 ^o	8,93	9-31
10 ^o	8,87	40-45
11 ^o	8,80	45-48
12 ^o	8,70	10-31
13 ^o	8,66	4-45
14 ^o	8,65	3-45
15 ^o	8,64	9-45

Tabela 3. Quinze pares de cultivares mais similares estimados a partir da distância Euclidiana no estudo de divergência fenotípica entre 74 cultivares de soja RR

Ordem	Distância Euclidiana	Pares de cultivares
1 ^o	0,46	3-4
2 ^o	0,84	1-37
3 ^o	0,86	1-64
4 ^o	1,13	21-30
5 ^o	1,14	1-50
6 ^o	1,23	11-52
7 ^o	1,25	4-49
8 ^o	1,27	3-49
9 ^o	1,28	6-49
10 ^o	1,31	36-56
11 ^o	1,32	2-47
12 ^o	1,37	53-30
13 ^o	1,41	4-6
14 ^o	1,43	54-65
15 ^o	1,48	3-6

Tabela 4. Mínimas e máximas distâncias obtidas entre cultivares pertencentes aos mesmos programas de melhoramento genético

Programas Melhoramento	Mínima		Máxima	
	Distância Euclidiana	Pares	Distância Euclidiana	Pares
Brasmax	0,46	3-4	3,35	6-9
Coodetec	2,51	10-12	6,04	10-14
Embrapa	1,13	21-30	8,43	29-31
Monsanto	1,71	37-47	8,87	40-45
Pioneer	1,55	55-56	6,79	53-58
TMG	1,93	65-72	6,68	67-68

Esses valores indicam maior similaridade genética entre as cultivares Brasmax.

A ampla variação entre medidas de distância indica divergência entre cultivares, assim como presença de variabilidade entre elas, segundo constataram Peluzio et al. (2009), Almeida, Peluzio e Aférri (2011) e Rigon et al. (2012), quando avaliavam a diversidade entre cultivares de soja utilizando características fenotípicas.

A análise de agrupamento pelo método de Tocher, gerada com base nas medidas de dissimilaridade, classificou as 74 cultivares de soja em sete grupos, sendo que três desses constituíram-se de uma única cultivar (Tabela 5).

O grupo I foi constituído de 55 cultivares, abrangendo a maior parte das cultivares avaliadas (74,3% do total de cultivares). Esse grupo foi representado por pelo menos uma cultivar de cada programa de melhoramento. Tal fato evidencia a similaridade entre as cultivares de soja, mesmo oriundas de programas de melhoramento distintos. Os grupos II, III e IV foram integrados por sete, seis e três cultivares representando, respectivamente, 9,4%, 8,10% e 4,0% das cultivares estudadas. As cultivares BRS279 (20), BRS Juliana (31) e CD243 (14) ficaram isoladas nos grupos V, VI e VII respectivamente, indicando serem as mais divergentes entre todas as cultivares.

Dentro dos programas de melhoramento, as 19 cultivares Embrapa foram distribuídas em seis grupos (I, II, III, IV, V e VI), as 12 cultivares Monsanto em quatro (I, II, III e IV) e as 11 cultivares TMG em três (I, II e III), indicando a existência de variabilidade genética dentro desses programas. A diversidade genética entre as sete cultivares Pioneer e entre as cinco Coodetec foi menor, estando a maioria das cultivares, exceto P99R01 (58) e CD243 (14), alocadas no grupo I. A cultivar P99R01 foi alocada no grupo IV e a CD243 ficou isolada no grupo VII. As sete cultivares da Brasmax foram alocadas no grupo I. O menor número de cultivares avaliadas dos programas Pioneer, Coodetec e Brasmax pode ter influenciado na menor diversidade apresentada. Entretanto, esse fator não foi importante quando foram comparados somente esses três programas já que as cultivares Brasmax, mesmo estando em maior número, foram todas alocadas em um único grupo. A formação de apenas um grupo indica que as cultivares Brasmax são bastante similares entre si.

Tabela 5. Grupos de cultivares de soja RR formados por meio da metodologia de agrupamento de Tocher a partir da distância Euclidiana estimada com base em dez caracteres agronômicos

GRUPO	CULTIVARES DE SOJA RR
I	3, 4, 49, 6, 8, 7, 48, 10, 5, 9, 12, 29, 18, 64, 1, 47, 24, 50, 37, 16, 39, 11, 52, 2, 38, 13, 71, 21, 53, 30, 61, 42, 22, 55, 23, 15, 57, 63, 54, 56, 74, 43, 27, 62, 73, 17, 36, 72, 66, 69, 35, 25, 65, 51
II	34, 68, 40, 44, 70, 46, 33
III	32, 41, 28, 60, 59, 67
IV	19, 45, 58
V	20
VI	31
VII	14

A formação de grupos indica a existência de diversidade entre os genótipos, pois uma das características da classificação de Tocher é manter a homogeneidade dentro dos grupos e a heterogeneidade entre os grupos (CRUZ, 2008). Vários autores têm utilizado o método de otimização de Tocher para estimar a diversidade entre genótipos, avaliados a partir de características agronômicas (FONSECA et al., 2006; BENITEZ et al., 2011; PELUZIO et al., 2012). Santos et al. (2011) avaliando a divergência entre 48 cultivares de soja verificaram a formação de 4 grupos distintos. Shadakshari et al. (2011) observaram a formação de 10 grupos quando avaliavam 50 genótipos de soja indianos.

O critério de agrupamento adotado pelo método UPGMA, representado por um dendrograma (Figura 1), também estabeleceu a formação de sete grupos distintos. Para análise do dendrograma, levou-se em consideração a possibilidade de um corte significativo, onde havia pontos de alta mudança de nível, conjuntamente com um exame visual do dendrograma.

O grupo I aglomerou 52 cultivares, sendo composto por 72,2% do total de cultivares estudadas. O grupo II incorporou três cultivares (4%), o grupo III somente duas cultivares (2,7%) e os grupos IV e VI foram formados por 10 e 5 cultivares,

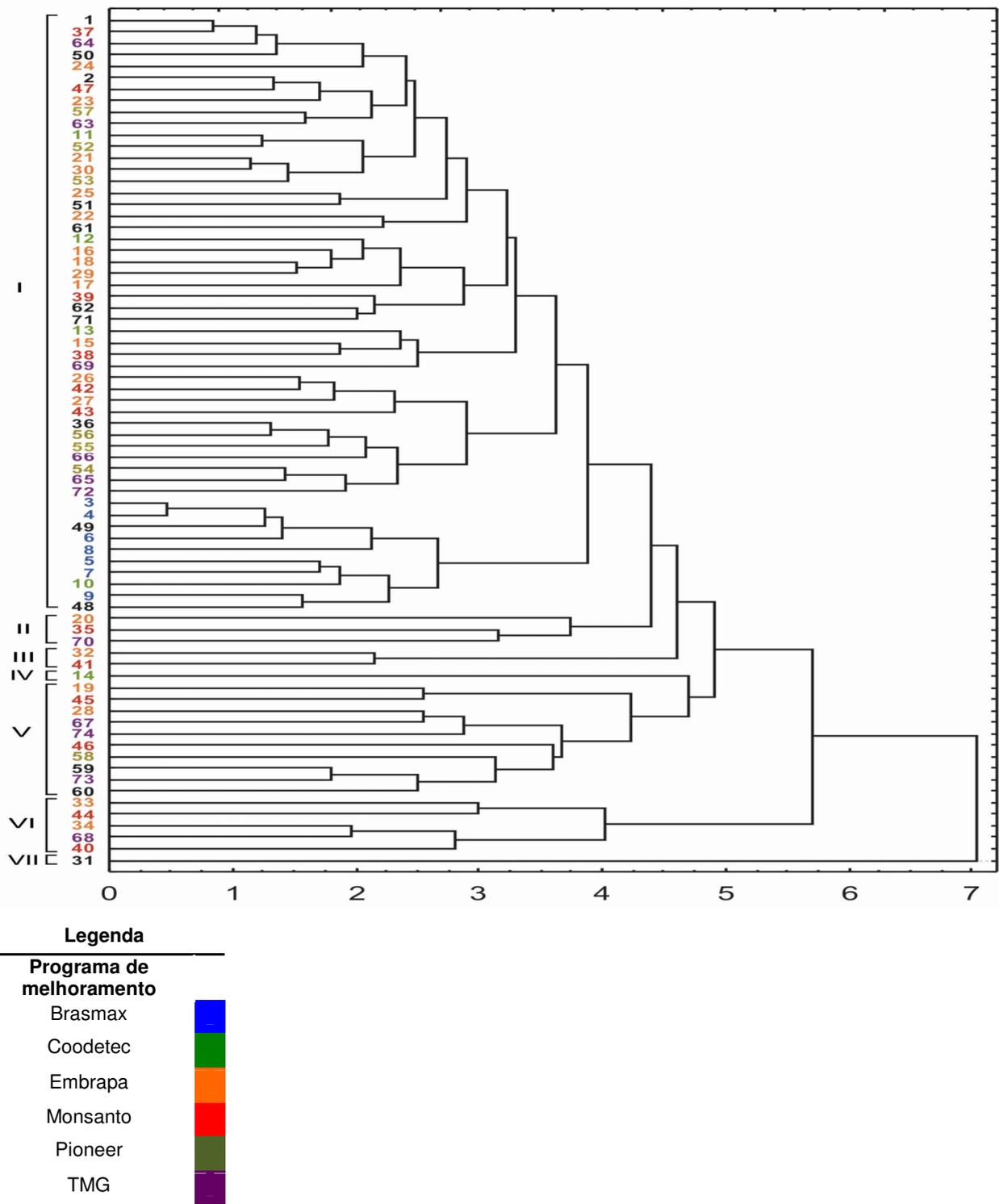


Figura 1. Dendrograma obtido pelo critério de agrupamento UPGMA, representando as distâncias Euclidianas entre 74 cultivares de soja RR, para dez caracteres agrônômicos

representando 13,5% e 6,75% do total. Os grupos V e VII foram formados pelas cultivares isoladas CD243 (14) e BRS Juliana (31).

Verificou-se semelhança na constituição dos grupos entre a metodologia hierárquica UPGMA e o método de otimização de Tocher. Predominantemente, a classificação dos genótipos nos grupos entre as duas metodologias foram coincidentes, salvo algumas exceções tais como, FTS Jaciara (35), TMG132 (70), TMG4001 (73) e TMG7188 (74) que pertenceram a grupos diferentes e a cultivar BRS 279 (20) que não ficou isolada. Em relação à diversidade dentro dos programas de melhoramento, a única diferença, quanto à formação dos grupos, foi encontrada entre as cultivares do programa TMG que se apresentaram distribuídas em quatro grupos (I, II, IV e VI) e não em três, como foi observado na análise de Tocher.

Semelhança entre os agrupamentos obtidos pelo método de Tocher e métodos hierárquicos também foram observadas por vários autores. Peluzio et al. (2009), avaliando 14 cultivares de soja concluíram que o método do vizinho mais próximo (ligação simples) e o método de Tocher foram concordantes entre si, distribuindo as cultivares em três grupos. Por sua vez, Almeida, Peluzio e Aférri (2011) estudando 12 cultivares, observaram a formação de 3 grupos em ambas as análises. Santos et al. (2011) concluíram que os métodos de agrupamento por UPGMA e Tocher também foram concordantes entre si e aglomeraram 48 genótipos de soja em quatro grupos.

A partir dos dendrogramas, gerados pelos métodos hierárquicos, é possível visualizar as distâncias entre genótipos. Observando o dendrograma, pode-se identificar as cultivares mais similares: BMX Apolo (3) e BMX Energia (4), ambas pertencentes ao programa Brasmax. A cultivar BRS Juliana (31) quando comparada com as 73 demais, destacou-se como a mais divergente, como pode ser comprovado pelo seu isolamento no grupo VII e pela maior distância observada no último nível de fusão. Avaliando a formação dos grupos é possível selecionar cultivares geneticamente distintas, pela simples visualização do dendrograma.

Em estudos de diversidade com base em caracteres fenotípicos, Cui et al. (2001) distinguiram cultivares de soja chinesas e americanas ao utilizar a metodologia UPGMA. Nogueira (2011) também utilizou esta metodologia e conseguiu distinguir 90 genótipos de soja, de acordo com sua região de adaptação.

A análise de agrupamento é uma técnica exploratória que visa a geração de hipóteses sobre o padrão de aglomeração estabelecido entre as cultivares. Sendo assim, pode ser suplementada ou complementada por outras metodologias de visualização, permitindo melhor compreensão da divergência entre os genótipos (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011).

Por meio da análise de componentes principais é possível avaliar a diversidade por meio de uma representação gráfica dos genótipos em dois ou mais planos e também, avaliar a influência de cada característica para a diferenciação destes genótipos.

Os componentes principais foram constituídos pela combinação linear de todas as variáveis originais (NDF, NDM, AIV, APM, AC, VA, NR, NVP, PCS e PG) independentes entre si e estimados com a finalidade de reter, por ordem de estimação, o máximo de informação em termos de variação total contida nos dados.

A importância dos componentes principais foi medida pela porcentagem de seus autovalores (variâncias) em relação a variância total (Tabela 6). As importâncias relativas dos caracteres nos componentes principais encontram-se na Tabela 7. Quanto maior o valor, em módulo, maior peso tem a característica naquele componente principal.

Por meio da análise verificou-se que os quatro primeiros componentes absorveram 80,84% da variação total acumulada. De acordo com Cruz et al. (2004) estimativas mínimas de 80% da variação total, entre os componentes iniciais, permitem explicar satisfatoriamente a variabilidade manifestada entre genótipos. Gizlice et al. (1993) estudando a diversidade genética entre cultivares americanas, verificaram que quatro componentes principais foram necessários para explicar mais de 80% da variação total.

O primeiro componente principal absorveu 36,65% da variação observada, sendo que a característica com maior contribuição para diversidade das cultivares foi número de dias para florescimento (NDF). O segundo componente principal explicou 21,19% e o caráter de maior peso foi produção de grãos (PG). O terceiro e o quarto componente principal absorveram 15,36% e 7,63% da variação e as características de maior influência nesses componentes foram valor agrônomo (VA) e número de dias para maturidade (NDM), respectivamente.

Tabela 6. Estimativas das variâncias associadas aos componentes principais, importância relativa (variância %) e acumulada referentes aos dez caracteres agronômicos avaliados

Componente principal	Variância	Variância(%)	ACUMULADA(%)
1	3,665	36,65	36,65
2	2,119	21,19	57,84
3	1,536	15,36	73,20
4	0,763	7,63	80,84
5	0,568	5,68	86,53
6	0,496	4,96	91,49
7	0,313	3,13	94,63
8	0,289	2,89	97,52
9	0,189	1,89	99,41
10	0,058	0,58	100,00

Tabela 7. Importância relativa dos dez caracteres em cada componente principal

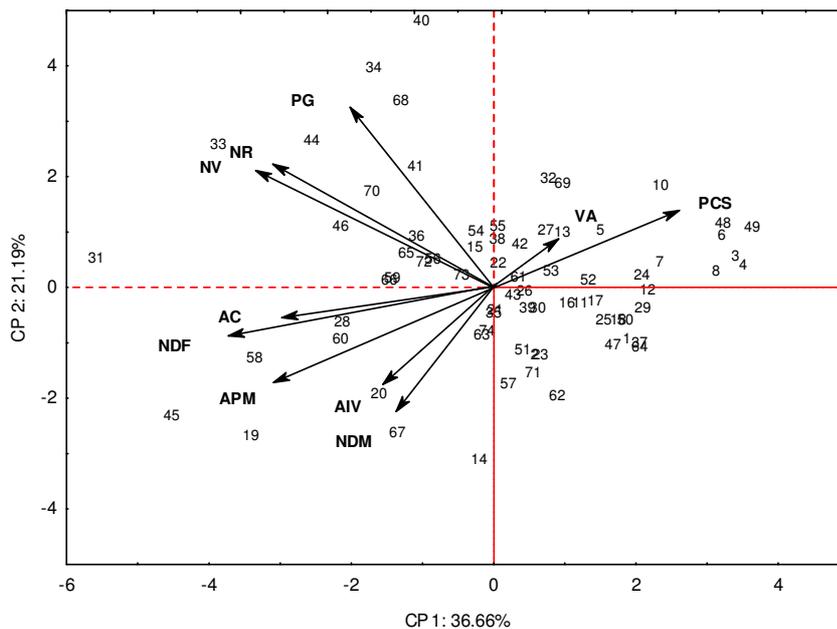
NDF	NDM	AIV	APM	AC	VA	NR	NVP	PCS	PG
0,4382	0,1665	0,1851	0,3664	0,3543	-0,1059	0,3746	0,4258	-0,3088	0,2411
0,1531	0,3982	0,3008	0,3042	0,1021	-0,1400	-0,3729	-0,3639	-0,2294	-0,5299
0,0284	0,2559	0,5055	0,1827	-0,3118	0,6327	-0,0010	0,0213	0,3181	0,2135
0,0127	0,6058	-0,4232	-0,3707	-0,0545	0,3733	0,0325	0,0561	-0,4119	0,0136
-0,3291	0,2481	-0,2574	0,2371	0,6857	0,1601	0,0260	-0,0867	0,451	0,0171
-0,1968	-0,5044	0,1608	0,0029	0,3227	0,5521	0,0472	-0,0679	-0,4704	-0,2095
0,5943	-0,2528	-0,5141	0,3202	-0,0793	0,3007	-0,3111	-0,0208	0,1405	-0,0486
0,0940	-0,0231	0,2056	-0,303	0,3228	-0,0445	-0,6983	0,0765	-0,0808	0,5003
-0,5167	0,0244	-0,197	0,5821	-0,2811	-0,0691	-0,2707	0,1935	-0,3136	0,2488
-0,0870	0,0172	0,0555	-0,1142	0,0068	0,0431	-0,2427	0,7917	0,1785	-0,5065

O padrão de similaridade das cultivares pôde ser conferido individualmente pela dispersão gráfica dos componentes principais (Figura 2), sendo que a identificação das cultivares encontra-se na Tabela 1. Observa-se que na representação entre os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2) pode ser distinguido o distanciamento de algumas cultivares mais divergentes como a CD243 (14), P99R01 (58), BRS278 (19), M8766 (45), BRS Juliana (31), BRS Silvânia (33), FTS Jaciara (34) e M7908 (40). Essas cultivares, com ênfase para a BRS Juliana (31), destacaram-se por suas características específicas relacionadas com o número de dias para o florescimento (NDF) e a produção de grãos (PG). À medida que se realizou a complementação gráfica (CP1 x CP3 e CP1 x CP4) a consistência no distanciamento entre esses genótipos pode ser confirmada. Almeida, Peluzio e Aférri (2011) verificaram que a variável número de dias para o florescimento foi um dos caracteres que mais contribuiu para distinguir 12 genótipos de soja, em estudos de

diversidade genética. Peluzio et al. (2009), Nogueira et al. (2011) e Santos et al. (2011) também observaram que essa foi uma das principais características para diferenciar genótipos de soja.

Apesar de não ter sido clara a separação das cultivares em grupos, pode-se observar pela Figura 2 a tendência de aglomeração da maior parte das cultivares em um único grupo, reforçando os resultados obtidos pelos agrupamentos de Tocher e UPGMA. Além disso, a cultivar BRS Juliana (31) foi mantida isolada, confirmando a maior dissimilaridade desta.

Bertini et al. (2010), trabalhando com identificação de genótipos superiores de feijão, verificaram que os métodos de Tocher, UPGMA e componentes principais foram concordantes, resultando em boas informações sobre os genótipos avaliados.



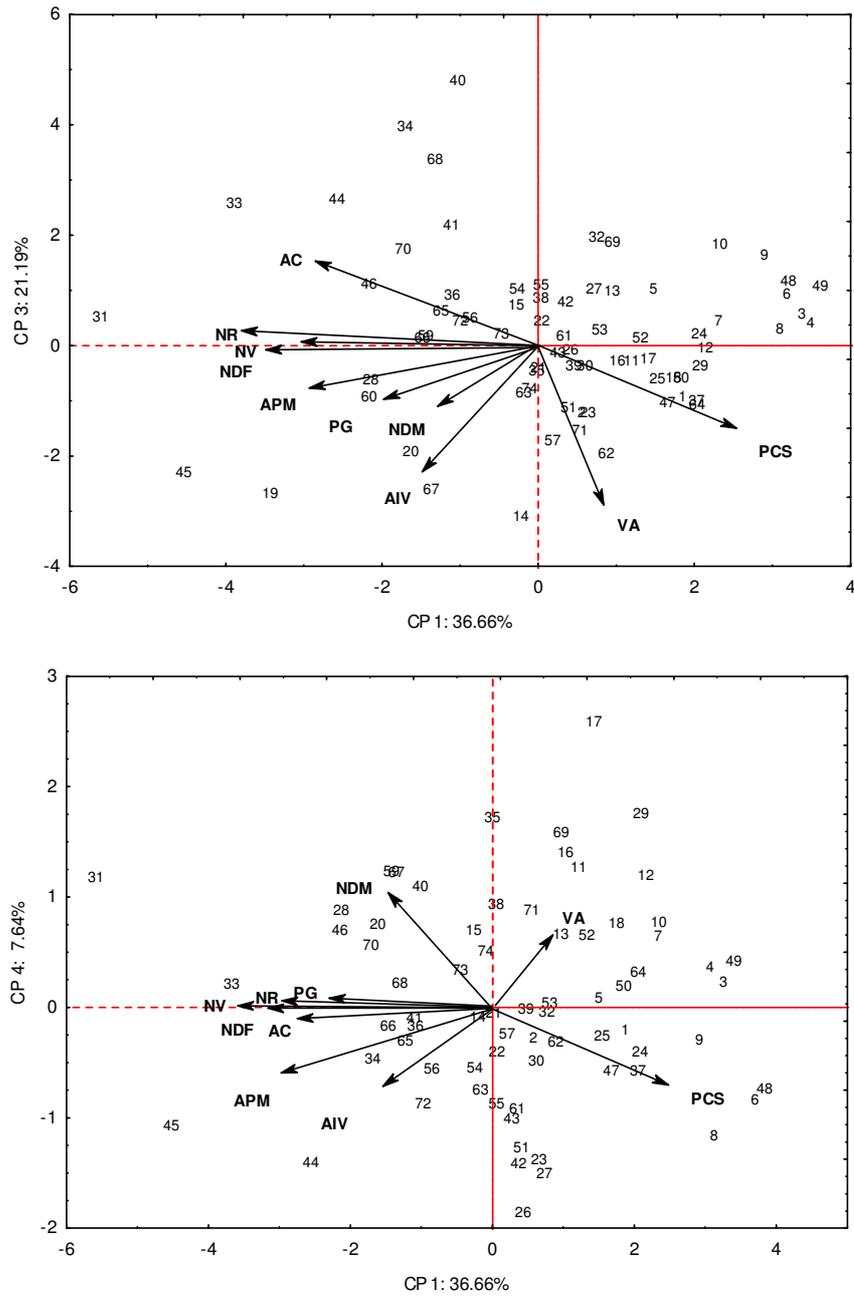


Figura 2. Dispersão gráfica das 74 cultivares de soja RR, considerando os componentes principais (CP1 x CP2, CP1 x CP3 e CP1 x CP4) referentes aos dez caracteres agrônômicos

4.2 Diversidade genética com base em marcadores moleculares

Para a caracterização da diversidade genética entre as 74 cultivares de soja RR estudadas foram selecionados 100 marcadores SSRs. Entre os 100 locos SSR avaliados, 86 foram polimórficos e informativos e 14 apresentaram monomorfismo.

A Figura 3 ilustra parte das reações com o iniciador SATT 294, para o qual visualiza-se a presença de polimorfismo no grupo de cultivares RR avaliadas.

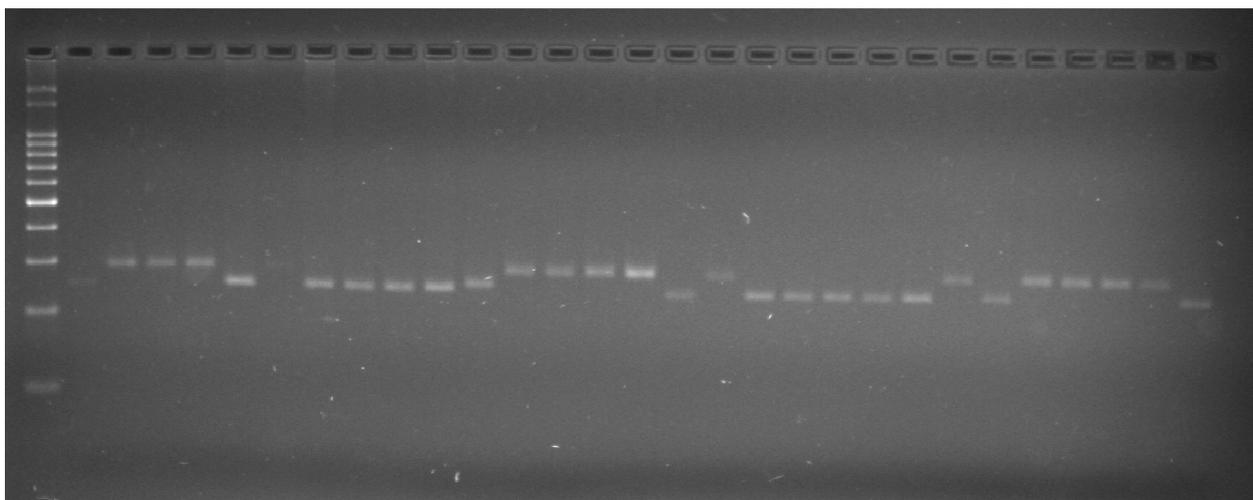


Figura 3. Perfil de um gel de agarose com presença de dois alelos produzidos pelas reações de amplificação utilizando o iniciador SATT 294. O tamanho dos fragmentos foi determinado com padrão de peso molecular 100pb DNA Ladder. Os fragmentos correspondem as cultivares 1 a 29

Os locos polimórficos estão distribuídos entre os 20 grupos de ligação da soja, conforme consta nas Tabela 8. As sequências senso e anti-senso dos iniciadores, o número do cromossomo no qual eles estão inseridos, o tipo de motivo e o número de repetições, a temperatura de anelamento específica, o número de alelos amplificados na população e o conteúdo de polimorfismo de cada SSR também podem ser visualizados na tabela 8.

Tabela 8. 86 iniciadores SSR utilizados na avaliação das cultivares RR, grupo de ligação (GL), número do cromossomo (Cr), motivos e repetições, temperatura de anelamento (Ta) e valores de conteúdo de informação polimórfica (PIC)

N°	Marcador	Sequência Senso e Anti-senso	GL	Cr	Motivo	Ta °C	Alelos	PIC
1	SAT_001	GCGGATACGACCAAAAATTGTT GCGAACTGCGAAGATACTACCC	D2	17	(AT)38	59	2	0,50
2	SAT_097	CGGCAACTGCGAAAAAT ACCCAACTTGTCAAACAGAC	A2	8	(AT)30	52	3	0,60
3	SAT_141	CGCAATCAAAGACCTGTT GCCTTGGCTATTTCCCTTA	G	18	(AT)11C(GA)12	49.5	2	0,44
4	SAT_250	GCGGTTTTTGCTTTAGGACATTTTGATA GCGTTGGGTACAACATATAATATTTTGGGA	A2	8	(AT)19	62	2	0,46
5	SATT 014	TCTGGTAAACATTCAACTTTTTATTT TCCAAATATGACATCATAAACTTCTA	D2	17	(TTA)8	53	2	0,08
6	SATT 020	GAGAAAGAAATGTGTTAGTGTA CTTTTCCTTCTTATTGTTTGA	B2	14	(AAT)16	47	3	0,41
7	SATT 022	GGGGGATCTGATTGTTATTTTACCT CGGGTTTCAAAAAACCATCCTTAC	N	3	(TAT)17	58	3	0,60
8	SATT 041	TGTTGTGTGGCTTTATTATT TTAAGGTGGGATATGGTC	D1b	2	(AAT)17	47	2	0,28
9	SATT 045	TGGTTTCTACTTTCTATAATTATTT ATGCCTCCTCCTCCT	E	15	(AAT)18	44	2	0,38
10	SATT 066	GGGAAGCTTAATAATGAAAATGACAC TTGATCACTTCTGTAACATTC	B2	14	(ATT)28	48	2	0,50
11	SATT 070	TAAAAATTAATAACTAGAAGACAAC TGGCATTAGAAAATGATATG	B2	14	(ATT)24	47	3	0,66
12	SATT 080	CCATAAAATAATAAAGGTCAAT TAATCAGTGGAAAAAAGTTAT	N	3	(ATT)23	45.7	2	0,46
13	SATT 094	CCAAGTGCCAATGAAG ATCCATGGTTTTTTGATG	O	10	(TAT)15TG(TTA)4	47	2	0,44
14	SATT 100	ACCTCATTTTTGGCATAAA TTGAAAAACAAGTAATAATAACA	C2	6	(TTA)13	47	2	0,18
15	SATT 129	TTCAGTACAAGTCGGGTGAATAATAATA TCACATGTTTCGGGACTTAAGGTAT	D1a	1	(AAT)25	57	3	0,63
16	SATT 141	CGGTGGTGGTGTGCATAATAA CCGTCATAAAAAAGTCCCTCAGAAT	D1b	2	(ATA)25	58	3	0,59
17	SATT 154	AGATACTAACAAGAGGCATAAAA AAAGAAACGGAACATAACTACATT	D2	17	(TAT)7CATC(ATT)20	50	2	0,49
18	SATT 166	TTGCACAGTTGATTTTTGTTT GCATCGAATTTCTGGATTAC	L	19	(TTA)19	52	2	0,42
19	SATT 173	TGCGCCATTTATTCTTCA AAGCGAAATCACCTCCTCT	O	10	(TAT)18	52	3	0,60
20	SATT 174	TTTCATTTCTTTGCCTTCT TTCGTAGTCCGTCTTTCAT	A1	5	(TTA)10	55	2	0,37
21	SATT 180	TCGCGTTTGTGAGC TTGATTGAAACCCAATA	C1	4	(TAT)16	42	2	0,37
22	SATT 184	GCGCTATGTAGATTATCCAAATTACGC GCCACTTACTGTTACTCAT	D1a	1	(ATT)14(TTG)5	45	3	0,51
23	SATT 185	GCGCATATGAATAGGTAAGTTGCACTAA GCGTTTTCTACAATAATTTTCAT	E	15	(TTA)29	50	3	0,61
24	SATT 187	GCGTTTTAATTTATGATATAACCAA GCGTTTTATCTCTTTTCCACAAC	A2	8	(TAA)18	54	2	0,45
25	SATT 193	GCGTTTCGATAAAAAATGTTACACCTC TGTTCCGATTATTGATCAAAAAAT	F	13	(TAA)23	56.5	2	0,50
26	SATT 194	GGGCCCAACTGATATTTAATTGTAA GCGCTTTGTGTTCCGATTTTGAT	C1	4	(ATT)4G	60	2	0,46
27	SATT 196	TTGGGAAATAGTGATTGAGGTAAAA AAATCCCCATTGAATGAGAATAAG	K	9	(TTA)5TTG(TTA)12	56	3	0,42
28	SATT 197	CACTGCTTTTTCCCTCTCT AAGATACCCCAACATTATTTGTAA	B1	11	(ATT)20	56.5	3	0,35

Tabela 8. Continuação

N°	Marcador	Sequência Senso e Anti-senso	GL	Cr	Motivo	Ta°C	Alelos	PIC
29	SATT 200	GCGATAAATGGTTAATGTAGATAA GCGAAAGGACAGATAGAAAGAGA	A1	5	(ATA)17	52	2	0,50
30	SATT 202	GGAATGCATGAGTATTAACCTCTTAT GGGCTAACGAACATGTAACCTTATCAAC	C2	6	(TTA)15	56.4	2	0,50
31	SATT 212	CCAATCCAAACAAATCCACT CAGCAATGATGATAATGAATGA	E	15	(TAA)9	53	2	0,20
32	SATT 220	GAGGAGGATCCCAAGGTAATAAT GCGCATGGAGAAAAGAG	M	7	(ATT)18	55	2	0,44
33	SATT 229	TGGCAGCACACCTGCTAAGGGAATAAA GCGAGGTGGTCTAAAATTATTACCTAT	L	19	(AAT)22	58	2	0,47
34	SATT 231	GCGTGTGCAAAATGTTTCATCATCT GGCACGAATCAACATCAAAACTTC	E	15	(TAT)32	61	2	0,26
35	SATT 236	GCGTGCTTCAAACCAACAACAACTTA GCGGTTTGCAGTACGTACCTAAAATAGA	A1	5	(ATT)19	63	2	0,50
36	SATT 238	GCGCCATTTTAAATGATTTATTTA GCGGAAAGAAGAGGAAGAAAG	L	19	(TTA)12	54	2	0,50
37	SATT 239	GCGCCAAAAAATGAATCACAAAT GCGAACACAATCAACATCCTTGAAC	I	20	(AAT)22	61	2	0,21
38	SATT 242	GCGTTGATCAGGTCGATTTTTATTTGT GCGAGTGCCAACCTAACTACTTTTTATGA	K	9	(TTA)26	50	2	0,20
39	SATT 250	CGCCAGCTAGCTAGTCTCAT AATTTGCTCCAGTGTTTTAAGTTT	M	7	(TA)12	54	2	0,18
40	SATT 257	GCGACTTTCTTTTCAATTTCACTCC GCGCAATTGTCACCAACACAT	N	3	(ATA)10	60	3	0,64
41	SATT 270	TGTGATGCCCTTTTCT GCGCAGTGCATGGTTTTCTCA	I	20	(TTA)16	58.3	3	0,61
42	SATT 274	GCGGGTCAATTAGTTTTGCGTCAGTT GCGCACGGTATATAATCGAACCTAT	D1b	2	(TAT)18	61	2	0,21
43	SATT 277	GGTGGTGGCGGGTACTATTACT CCACGCTTCAGTTGATTCTTACA	C2	6	(ATA)41	58	2	0,04
44	SATT 286	GCGGCGTTAATTTATGCCGAAA GCGTTTGGTCTAGAATAGTTCTCA	C2	6	(ATT)18	56.8	2	0,06
45	SATT 294	GCGGGTCAAATGCAAATTTATTTT GCGCTCAGTGTGAAAGTTGTTCTAT	C1	4	(TAT)23	60.2	2	0,50
46	SATT 302	GCGAACTGTAGTTTACTAAAAATAAGTG GCGGACTGAATTAATTTGGTGTGAATT	F	12	(ATA)13AAG(TAA)4	55.9	2	0,49
47	SATT 303	AAAAGCGACGACCTATG TGAACGTTCTATCAACACA	G	18	(TAA)20	47.3	3	0,55
48	SATT 308	GCGTTAAGGTTGGCAGGGTGGAAAGTG GCGCAGCTTTATACAAAAATCAACAA	M	7	(TTA)22	62.5	4	0,72
49	SATT 313	GCGGTAAGTCATGGCTTTTTAATCTT GCGCGAGGTATGGAACCTAACTCACA	L	19	(ATT)14	62	2	0,50
50	SATT 317	GCGAACAACTTTCTATACATGATAACA GCGGGTATATTTTTGTACATAAGTTGGAA	H	12	(TCAT)3(TTA)21	59	2	0,34
51	SATT 335	CAAGCTCAAGCCTCACACAT TGACCAGAGTCCAAAGTTCATC	F	13	(TCT)4	57	3	0,46
52	SATT 342	GGTGCAAGGAAAATGGAATAA GATACAACGTCGTGCTACTATCCAAATA	D1a	1	(ATT)21	58.2	2	0,48
53	SATT 353	CATACACGCATTGCCTTTCTGAA GCGAATGGGAATGCCTTCTTATTCTA	H	12	(TTA)17	63	2	0,50
54	SATT 355	GCGTCCCAGGACATCATCATCATC GCGTAGCGTGTATTTTTGTGTTTG	E	15	(CAT)6(AAT)14	61	3	0,41
55	SATT 358	GCGGCGCTTTATGTAACAATACGATTT GCGAGTAAAAGCAGAGTGCGGAGTA	O	10	(ATA)19	63	3	0,46
56	SATT 371	TGCAAACAACTGGATTCACCTCA GAGATCCCGAAATTTAGTGTAAACA	C2	6	(TAA)11	56.2	2	0,40
57	SATT 384	TGGGGGTCAATTTAATTTGTGC ATTTCCCTTTACCCACCTCTGTTT	E	15	(ATA)16	61	2	0,15
58	SATT 396	GCGAAAAGGATAAGTTTAAAAAT GCGGGCCTGTAAAGGGATTCC	C1	4	(TTA)9	56	2	0,11

Tabela 8. Continuação

Nº	Marcador	Sequência Senso e Anti-senso	GL	Cr	Motivo	Ta°C	Alelos	PIC
59	SATT 398	GTAAGGGCGGGTATCAACAGTGTCT GGTAACCGCGGACTCAGTTAAAC	L	19	(ATTA)3	61	2	0,47
60	SATT 399	AAGCCAACCTTATAAATCTTTTCAT ATATGGGCTTACTTACCCATCATAGA	C1	4	(ATT)14	54.5	2	0,15
61	SATT 415	GCGTCTCCCTTAATCTTCAAGC GCGTGTGACGGTTCAAAATGATAGTT	B1	11	(TAA)4	59.2	2	0,20
62	SATT 417	TCTTGCTAATTGCTTCATTTTCAT AATTGCTTGGGATTTTCATTT	K	9	(AAT)18	54	2	0,49
63	SATT 420	GCGTATTCAGCAAAAAATATCAA TTATCGCACGTGTAAGGAGACAAAT	O	10	(TAT)16	57	2	0,44
64	SATT 423	TTCGCTTGGGTTCCAGTTACTT GTTGGGGAATTAATAAAATG	F	13	(TAT)19	50	2	0,47
65	SATT 426	GCGCCCATTTATTATTTTCCTGAATTGT GCGAATGCCTAATGTGATGATAAAAAATA	B1	11	(ATT)5	62.7	2	0,13
66	SATT 434	GCGTTCCGATATACTATATAATCCTAAT GCGGGGTTAGTCTTTTTATTTAACTTAA	H	12	(ATA)32	55.5	2	0,44
67	SATT 442	CCTGGACTTGTGGTCTCATCAA GCGGTTCAAGGCTTCAAGTAGTCAC	H	12	(TAA)35	61	2	0,40
68	SATT 449	GCGTGCTTCTTATATTAGGTGTTAGT GCGCATTGGAGTTTTTGCTTTT	A1	5	(TTA)21	56	3	0,63
69	SATT 458	TTGGGTTGACCGTGAGAGGGAGAA GCGAACCACAACAACAATCTTCA	D2	17	(TAT)30	64	2	0,50
70	SATT 468	GCGTCTCTTATTTTGACCTTTTTAACTT GCGTTTTGTATTTGGTCTATCTGCTTAG	D1a	1	(ATTT)3	59	2	0,34
71	SATT 476	TTTGCTGATTAATAAAACAAAACTG TTGTTAGAAATGGGGACTACTTCACTA	C1	4	(ATA)20	56.3	2	0,49
72	SATT 480	GTCCCCACCATCACAAGCGATCA GCGGTTAGCTTCGGTTATTAAT	A2	8	(TAT)14	56.4	2	0,37
73	SATT 496	GCGATCCCTTTATGTTGGTATTACATT GCGGCACACAAGTAGTTGTGAAACTAA	I	20	(ATT)13	62	2	0,50
74	SATT 510	GCGAGTTTCGCGCTTACCACCTCAGCTT CCCTCTTATTTACCCCTAAGACCTACAA	F	13	(TAT)9	62	3	0,64
75	SATT 540	CTGGCGAATCAAGCTTTGTAAAC CCGTGATTGCGAAGAGGATATT	M	7	(TTA)15	58	2	0,49
76	SATT 542	CACCAGCACAGAACAATCATT CACGGTCTAACCTTTCCCTTCTA	D1b	2	(TAA)19	55	2	0,16
77	SATT 545	CAATGCCATTCCATATTTGTT CAATTGCCCTAGTTTTGATAG	A1	5	(TTA)24	52	2	0,49
78	SATT 551	GAATATCACGCGAGAATTTTAC TATATGCGAACCCTCTTACAAT	M	7	(AAT)8	54	2	0,33
79	SATT 556	GCGATAAAACCCGATAAATAA GCGTTGTGCACCTTGTTTTCT	B2	14	(AAT)14	54	3	0,56
80	SATT 562	GCGGATTGACTGAGATGTTTTAT GCGGCGGCAGGTTAAATGGATTGA	I	20	(TTA)18	57	2	0,37
81	SATT 571	GGGTAGGGGTGGAATATAAG GCGGGATCCGCGGATGGTCAAAG	I	20	(ATA)14	50	3	0,52
82	SATT 591	GCGCGACCTTAATGATA GCGCCCAAAGCTTAAAAATTAATA	A1	5	(ATT)17	50.8	2	0,26
83	SATT 610	CCCTCCGCAAGCAATAATTAATCT GCGGAATGCTTCCATTTTAT	G	18	(ATA)9	56.8	2	0,46
84	SATT 632	GGGCTATGAAGGAATGGAAAGGA CCCATATTGAAGATTTGAAGTAAT	A2	8	(AAT)17	53.6	2	0,50
85	SATT 663	GCGTCATGCAATGTTGTATAAT GCGACTGCAGATAAAGTTGACTGGTAGT	F	13	(TTA)27	56	2	0,21
86	SATT 703	GCGATGGGTGGATTCTAGAT GCGGTGCTGTAGGCTTTCCAAAAT	D1b	2	(ATT)27	56.9	2	0,47

A diversidade genética entre as 74 cultivares avaliadas foi estimada com 86 SSRs. Este número é superior ao encontrado na literatura em estudos sobre diversidade em soja. Wang et al. (2006) avaliando a diversidade de 129 acessos de soja, utilizaram 60 SSRs. Min et al. (2010) utilizaram 40 SSRs na avaliação de 40 genótipos de soja chinesa. Recentemente, Tantasawat et al. (2011) utilizaram 11 marcadores microssatélites para avaliarem a diversidade entre 25 genótipos de soja da Tailândia.

A importância do número de marcadores utilizados em uma análise foi abordado por Cruz, Ferreira e Pessoni (2011), que afirmam que quanto maior o número de marcadores avaliados, maior será a possibilidade de quantificar apropriadamente a diversidade entre acessos.

Os 86 marcadores amplificaram 195 alelos, oscilando entre dois e quatro alelos por loco, com média de 2,27. Esses valores são semelhantes aos relatados por Vieira et al. (2009) que ao analisarem 53 cultivares de soja com 53 SSRs observaram a amplificação de 124 alelos, variando de dois a quatro alelos por loco com média de 2,34.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC), calculado para estimar a informatividade de cada iniciador, variou de 0,04 (Satt 277) a 0,72 (Satt 308) com média de 0,42, indicando considerável informatividade dos locos SSRs entre as cultivares estudadas. Vieira et al. (2009) observaram valores de PIC variando entre 0,16 a 0,66 e média de 0,47 em avaliação com 53 SSRs.

Narvel et al. (2000) utilizando 74 microssatélites para estimar a diversidade entre cultivares elites de soja e alguns acessos, encontraram valores de PIC variando de 0 a 0,84 com média de 0,56 nos acessos utilizados e de 0 a 0,79 com média de 0,50 nas variedades elites, sendo um bom indicativo de que grupos de genótipos com uma base genética estreita apresentam uma menor diversidade genética.

Mulato et al. (2010) utilizando 30 SSRs para caracterizar 79 acessos de soja, observaram altos valores de PIC, variando de 0,16 a 0,92, sendo tal fato explicado pela utilização de genótipos introduzidos (PIs) de diferentes regiões do mundo.

Marcadores SSR têm sido muito eficientes em examinar a diversidade genética (LABORDA et al., 2005; GOUVÊA et al., 2010; TANTASAWAT et al.; 2011)

conforme, também verificado no presente trabalho, cujos marcadores SSR selecionados foram informativos e eficientes para o estudo de diversidade genética em soja.

As medidas de dissimilaridade, obtidas pela genotipagem dos 86 SSRs e estimadas a partir do coeficiente de Jaccard, oscilaram entre 0,07 a 0,73. Na matriz de dissimilaridade foram extraídos os 15 pares de cultivares mais divergentes (Tabela 9) e os 15 pares de cultivares mais similares (Tabela 10). A menor distância encontrada ocorreu entre as cultivares BMX Força (5) e BMX Potência (8), enquanto a maior distância foi entre BMX Titan (9) e M7578 (38).

Coeficientes de dissimilaridade oscilando entre 0,07 e 0,76 foram obtidos por Oda (2007) ao avaliar 21 cultivares de soja com 38 microssatélites. Vieira et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes com distâncias variando de 0,02 a 0,73, indicando a existência de variabilidade entre as cultivares.

Singh et al. (2010), estudando a divergência genética entre 44 genótipos de soja, com diferenças de sensibilidade ao fotoperíodo, obtiveram um valor médio de dissimilaridade de 0,33.

Tabela 9. Quinze pares de cultivares mais divergentes estimados pelo coeficiente de Jaccard no estudo de divergência genética entre 74 cultivares de soja RR

Ordem	Jaccard	Pares de cultivares
1 ^o	0,68050	9-38
2 ^o	0,67490	8-38
3 ^o	0,65844	5-38
4 ^o	0,64865	57-74
5 ^o	0,64662	34-50
6 ^o	0,64122	16-44
7 ^o	0,63889	4-31
8 ^o	0,63866	10-23
9 ^o	0,63813	38-67
10 ^o	0,63673	48-73
11 ^o	0,63309	20-50
12 ^o	0,63248	25-53
13 ^o	0,63158	7-38
14 ^o	0,63063	4-73
15 ^o	0,62903	5-15

Tabela 10. Quinze pares de cultivares mais similares estimados pelo coeficiente de Jaccard no estudo de divergência genética entre 74 cultivares de soja RR

Ordem	Distância Euclidiana	Pares de cultivares
1º	0,0760	5-8
2º	0,1059	3-4
3º	0,1273	34-72
4º	0,1497	16-17
5º	0,1547	24-61
6º	0,1855	29-32
7º	0,1865	18-32
8º	0,1923	53-54
9º	0,2069	21-34
10º	0,2080	20-72
11º	0,2105	30-72
12º	0,2233	16-18
13º	0,2256	17-18
14º	0,2374	65-66
15º	0,2531	2-23

As máximas e mínimas medidas de dissimilaridade encontradas dentro dos programas de melhoramento Brasmax, Coodetec, Embrapa Monsanto, Pioneer e TMG estão listadas na Tabela 11. O programa Brasmax mais uma vez apresentou a menor dissimilaridade entre cultivares (0,07) entre todas as mínimas medidas observadas. Além disso, também apresentou a menor dissimilaridade entre cultivares (0,51) quando observadas as máximas medidas entre todos os programas, indicando a existência de menor variabilidade genética entre suas cultivares.

Tabela 11. Mínimas e máximas medidas de dissimilaridade obtidas entre cultivares pertencentes aos mesmos programas de melhoramento genético

Programas Melhoramento	Mínima		Máxima	
	Coeficiente Jaccard	Pares	Coeficiente Jaccard	Pares
Brasmax	0,0764	5-8	0,5102	4-6
Coodetec	0,2666	11-14	0,5617	10-14
Embrapa	0,1497	16-17	0,6104	16-23
Monsanto	0,3773	46-47	0,5901	39-47
Pioneer	0,1923	53-54	0,5577	54-57
TMG	0,2374	65-66	0,6031	68-73

A análise de agrupamento, realizada com base na matriz de dissimilaridade e pelo critério UPGMA, revelou a formação de seis grupos (Figura 4). A análise de “bootstrap” exprimiu alta representatividade estatística para grande parte dos “nós” do dendrograma construído. O coeficiente de correlação cofenética encontrada entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma foi 0,66, significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste t. Esses resultados indicam que o agrupamento das cultivares observado no dendrograma representou bem as distâncias genéticas estimadas entre as cultivares.

O grupo I foi formado por 14 cultivares, representando 18,9% do total. As cultivares M7578 e M7211 formaram os grupos isolados II e III, indicando serem as mais divergentes. O grupo IV foi constituído por 29 cultivares, abrangendo a maior parte das cultivares (39,1%), sendo composto por genótipos de quase todos os programas de melhoramento. Os grupos V e VI foram formados por 18 e 11 cultivares representando, respectivamente, 24,3% e 14,8% do total (Figura 4).

Dentro dos programas de melhoramento, as 12 cultivares Monsanto foram distribuídas em todos os seis grupos formados (I, II, III, IV, V e VI) sendo que, duas dessas (M7578 e M7211) formaram isoladamente os grupos II e III. As 11 cultivares TMG foram distribuídas em três grupos (IV, V e VI). As 19 cultivares da Embrapa apresentaram menor diversidade, sendo alocadas em apenas dois grupos (I e IV), assim como as cultivares Coodetec (5) e Pioneer (7) que ficaram alocadas nos grupos IV e V e V e VI respectivamente. Todas as sete cultivares Brasmax alocaram-se no grupo V, indicando maior similaridade genética entre as mesmas (Figura 4).

Ainda pelo dendrograma (Figura 4), é possível visualizar a formação de dois subgrupos exclusivos de alguns programas de melhoramento. As cultivares BRS 243, BRS 244, BRS 246, BRS Charrua e BRS Pampa, da Embrapa, formaram um subgrupo dentro do grupo I. Apesar desta formação, as cultivares da Embrapa estão distribuídas em dois grupos o que indica existência de variabilidade. O contrário aconteceu com as cultivares do programa Brasmax (BMX Apolo, BMX Energia, BMX Força, BMX Potência, BMX Impacto e BMX Magna) onde todas formaram um subgrupo dentro do grupo V.

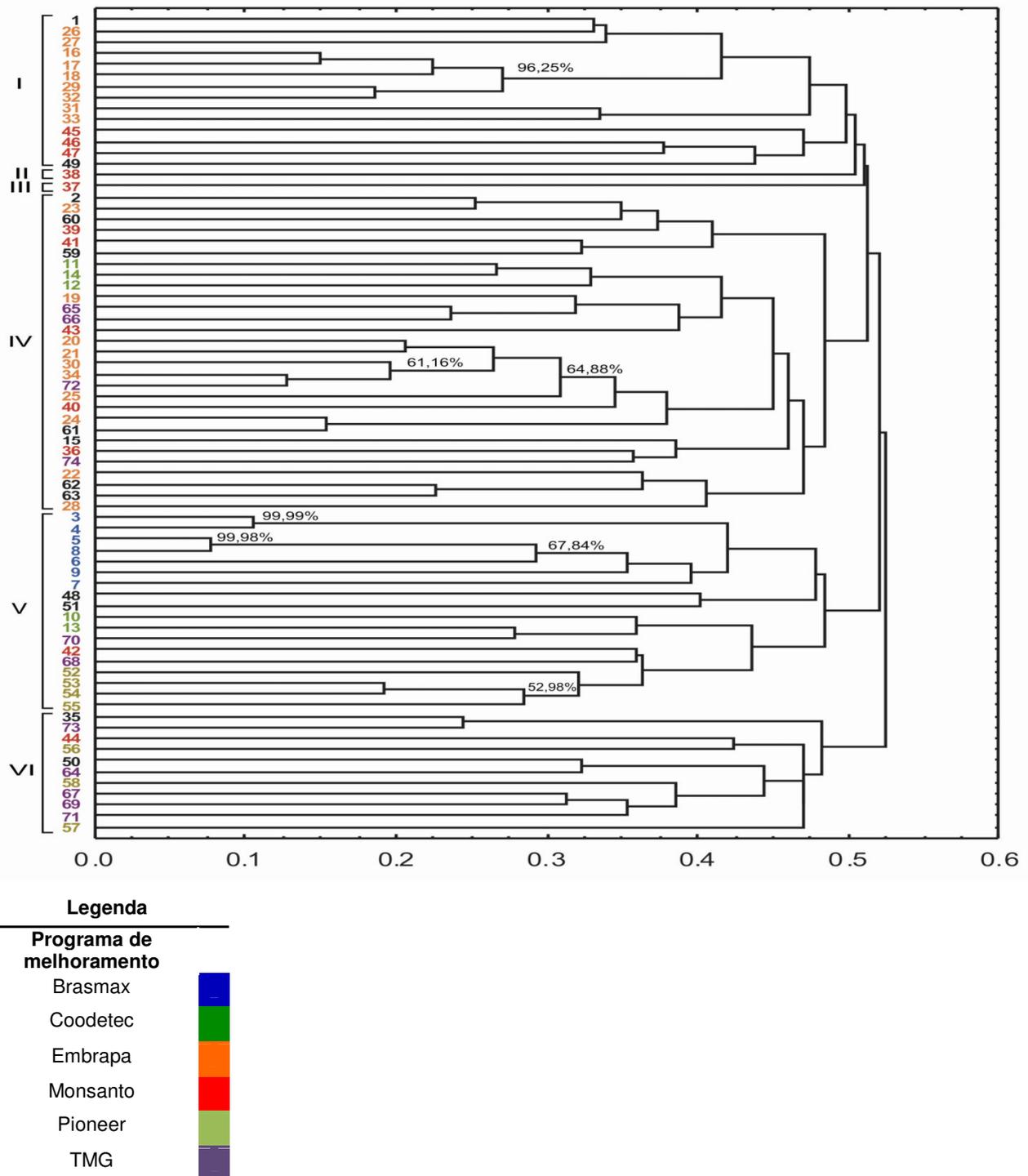


Figura 4. Dendrograma obtido pelo critério UPGMA, representativo da dissimilaridade genética entre 74 cultivares de soja RR, em função de 86 marcadores SSR. Valores nos nós representam o nível de suporte de “Bootstrap”

Para obter melhores estimativas sobre a diversidade genética entre as cultivares estudadas o ideal seria uma comparação dos agrupamentos gerados com base na matriz de dissimilaridade por marcadores moleculares e os coeficientes de parentesco. Todavia, tal acesso não foi possível, já que as genealogias de todas as cultivares deste estudo não estão disponíveis, principalmente daquelas pertencentes a empresas privadas. Isso reforça, ainda, a importância de estudos de diversidade, com grupos distintos de genótipos.

Análises de agrupamento por meio de métodos hierárquicos têm sido amplamente utilizadas em estudos de diversidade genética em soja e têm indicado boa concordância entre os dendrogramas gerados e o parentesco entre as cultivares (PRIOLLI et al. 2002; YAMANAKA et al., 2007; MULATO et al., 2010). Estudando 317 cultivares brasileiras de soja, Bonato et al. (2006) observaram que o dendrograma gerado com a matriz de dissimilaridade genética obtida com marcadores AFLP foi consistente com a genealogia dos genótipos. Priolli et al. (2010) verificaram que o agrupamento de 168 cultivares de soja, obtido pelo método UPGMA, com base nas informações de marcadores SSR foram consistentes com ancestrais em comuns entre as cultivares pertencentes ao mesmo grupo.

4.3 Comparação entre diversidade obtida a partir de caracteres fenotípicos e marcadores moleculares

Tanto os dados fenotípicos representados por meio dos caracteres agrônômicos quantitativos, quanto os moleculares, mostraram-se ferramentas informativas na caracterização da divergência existente entre as cultivares de soja RR. A diversidade encontrada entre as 74 cultivares, é condizente com os estudos conduzidos a partir de marcadores moleculares por Vieira et al. (2009), Dellagostin et al. (2011) e Nogueira, 2011 e, também, com a diversidade encontrada utilizando caracteres agrônômicos por Peluzio et al. (2009), Santos et al. (2011) e Rigon et al. (2012).

Pela análise dos dois métodos verificou-se que as cultivares do programa de melhoramento da Monsanto, ficaram distribuídas em vários grupos, indicando alta diversidade entre as cultivares. A maior heterogeneidade deste programa pode estar relacionada com o fato desta empresa ser a responsável pelo desenvolvimento da

soja RR e por sua amplitude de pesquisas com a inserção do gene entre diferentes cultivares de soja (GREEN, 2009).

Em relação às cultivares do programa TMG, embora tenham se dividido em quantidades menores de grupos, também apresentaram divergência genética relativamente alta quando analisadas pelos dois métodos. Por sua vez, para os programas Coodetec, Pioneer e Brasmax, ambos os métodos indicaram baixa diversidade, uma vez que essas cultivares ficaram distribuídas em poucos grupos ou em apenas um grupo, como é o caso dos genótipos Brasmax.

A utilização de genótipos altamente relacionados como receptores do gene RR dentro dos programas de melhoramento de soja pode ter causado a baixa diversidade genética observada por este estudo.

Li et al. (2008), avaliando a diversidade genética entre 101 cultivares de soja chinesas também verificaram que cultivares pertencentes ao mesmo programa de melhoramento se alocavam dentro de um mesmo grupo e atribuiu este resultado ao uso restrito de parentais no desenvolvimento dessas cultivares. Vieira et al. (2009) também ressaltaram a baixa diversidade encontrada entre cultivares de um mesmo programa de melhoramento, quando avaliavam 53 cultivares de soja comercializadas no Brasil.

A formação de um grupo contendo a maioria das 74 cultivares, também foi verificada entre as análises fenotípicas e moleculares. Tal fato evidencia a existência de similaridade genética entre as cultivares de soja RR, mesmo entre programas de melhoramento distintos.

Santos et al. (2011), analisando a diversidade entre 48 cultivares de soja brasileiras, verificaram a tendência das cultivares transgênicas em formarem um único grupo bastante similar. Sneller (2003) estudando a estrutura genética da população elite de soja norte-americana e o efeito dos cruzamentos recorrentes com soja RR na divergência genética dessas linhagens concluiu que o advento da tecnologia RR teve pouco impacto sobre a diversidade genética em geral das cultivares. Entretanto, a baixa diversidade encontrada entre as linhas elite de algumas empresas, levou-o a concluir que a restrita diversidade dentro de alguns programas, juntamente com o baixo intercâmbio de germoplasma, poderia afetar a variabilidade disponível futuramente.

Apesar de ambas as análises compartilharem vários resultados, por outro lado revelaram diferenças. Os pares de cultivares mais divergentes encontrados por meio da distância Euclidiana (dados fenotípicos) diferiram-se daqueles obtidos pelo coeficiente de Jaccard (dados moleculares). No entanto, pode-se verificar que em ambas, as mínimas distâncias ocorreram sempre entre as cultivares Brasmax, que já haviam demonstrado alta similaridade entre si. Diferenças também foram observadas no agrupamento das cultivares do programa da Embrapa. Tais genótipos foram menos divergentes, quando analisados pelos marcadores moleculares, distribuindo-se em apenas dois grupos, e não em seis grupos, como pela análise fenotípica.

A utilização dos caracteres fenotípicos e marcadores moleculares fornecem uma visão mais completa acerca da diversidade presente nos genótipos avaliados. CHIORATTO et al. (2007) ao caracterizarem a diversidade existente entre 220 acessos de feijão concluíram que descritores agromorfológicos e marcadores moleculares devem ser utilizados juntos em estudos de diversidade, contribuindo para a confiabilidade dos resultados e correta compreensão da relação entre os acessos.

SINGH et al. (1991) relataram que a melhor forma de se identificar divergência entre genótipos é o uso combinado de marcadores moleculares e descritores agromorfológicos, promovendo um complemento nos resultados.

O coeficiente de correlação encontrado entre as medidas de dissimilaridade estimadas pelas características fenotípicas e moleculares foi baixo, porém significativo ($r=0,11$, $P<0,01$) pelo Teste t e pelo teste de Mantel com 10.000 simulações.

Gouvêa et al. (2010) também encontraram correlações baixas entre as distâncias genéticas baseadas em SSR e os dados fenotípicos, em seringueira ($r=0,13$, $P<0,01$). Já Chioratto et al. (2007), ao correlacionarem matrizes de dissimilaridade, obtidas a partir de variáveis agronômicas e descritores moleculares RAPD em feijão, encontraram coeficiente de correlação médio ($r=0,33$ $P<0,01$) e significativo pelo teste de Mantel.

A diferença entre os pares de cultivares mais divergentes encontrados pela Distância Euclidiana e do Coeficiente de Jaccard, bem como a baixa correlação

encontrada entre os dados fenotípicos e moleculares, indica que cada método estimou a divergência entre genótipos de uma forma distinta. Na literatura, algumas considerações vêm sendo apresentadas quando a correlação observada entre distâncias obtidas por meio de marcadores moleculares e caracteres fenotípicos é relativamente baixa.

Segundo BARBOSA-NETO (1996), a baixa correspondência entre dados fenotípicos e moleculares se deve ao fato dos marcadores utilizados considerarem todo o genoma, incluindo regiões que não contribuem para a expressão de genes. A baixa correlação pode ser devida ao fato das marcas utilizadas não estarem ligadas aos genes que codificam as características em estudo (CHARCOSSET et al., 1991). Roldán-Ruiz et al. (2001), afirmam que um modo alternativo para lidar com a baixa correlação entre distância genética e fenotípica, pode ser selecionando apenas marcadores moleculares associados aos caracteres fenotípicos.

Outro fator que dificulta a ocorrência de associação entre dados fenotípicos e moleculares é o fato da variação detectada pelos marcadores moleculares ser não adaptativa e, portanto, não sujeita a seleção, ao contrário dos caracteres agronômicos que são sujeitos tanto à seleção natural quanto artificial, além de sofrerem grande influência ambiental (VIEIRA et al., 2005).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As cultivares de soja utilizadas neste trabalho constituem uma amostra representativa das cultivares RR cultivadas e comercializadas no Brasil. Sendo assim, foi possível fazer uma inferência sobre a diversidade genética existente entre os programas de melhoramento genético que as desenvolveram.

Mesmo sem a informação sobre as genealogias, os dendrogramas obtidos a partir dos dados fenotípicos e moleculares agruparam as cultivares refletindo suas origens. Os resultados obtidos nesse estudo apontaram alguns programas de melhoramento com menor diversidade genética indicando que estes utilizam de uma base genética estreita para desenvolver suas cultivares RR, uma vez que o melhoramento genético com o uso de parentais restritos leva, potencialmente, ao estreitamento da variabilidade genética.

O plantio de cultivares com estreita base genética em extensas áreas, está sujeito à maior pressão de doenças, pragas e estresses ambientais, existindo o risco da vulnerabilidade genética. Esforços por parte dos programas de melhoramento de soja na ampliação da base genética é de extrema importância para diminuir esses fatores. A introdução de variabilidade nos programas de melhoramento da soja, visando gerar novas combinações a partir da ampliação da base genética da cultura, é fundamental para fazer frente a novas demandas, como aumentos de produtividade e de qualidade.

A seleção de cultivares mais divergentes, a partir dos dendrogramas apresentados é uma alternativa viável e que pode ser utilizada comercialmente para evitar perdas na produção que estejam relacionadas ao uso extensivo de cultivares com base genética estreita.

6. CONCLUSÕES

Verificou-se a existência de variabilidade genética entre as cultivares de soja RR.

O programa de melhoramento genético da Monsanto apresentou maior diversidade genética. E o programa da Brasmax apresentou menor diversidade genética entre suas cultivares.

Dentre os caracteres agronômicos avaliados, o número de dias para florescimento (NDF), produção de grãos (PG), valor agronômico (VA) e número de dias para maturidade (NDM) são os mais indicados para análise da diversidade fenotípica em soja.

Tanto os caracteres agronômicos quantitativos, quanto os marcadores moleculares microssatélites apresentam-se como ferramentas informativas para estimar a divergência existente entre as cultivares de soja RR.

Os diferentes agrupamentos obtidos a partir dos caracteres agronômicos e marcadores moleculares SSR indicam capacidade diferencial na estimativa da divergência existente entre genótipos avaliados, devendo ser utilizados como ferramentas complementares.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA NETO, F. **Marcadores microssatélites na identificação de cultivares de soja**. 2001. 46 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

ALMEIDA, R. D.; PELUZIO, J. M. AFFÉRRI, F. S. Divergência genética entre cultivares de soja, sob condições de várzea irrigada, no sul do Estado Tocantins. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 1, p. 108-115, 2011.

AMORIM, E. P.; LESSA, L. S.; LEDO, C. A. S.; AMORIM, V. B. O.; REIS, R. V. dos ; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; SILVA, S. O. Caracterização agronômica e molecular de genótipos diplóides melhorados de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, p. 154-161, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452009000100022>>.

ANTONIOU, M.; BRACK, P.; CARRASCO, A.; FAGAN, J.; HABIB, M.; KAGEYAMA, P.; LEIFERT, C.; NODARI, R. O.; PENGUE, W. **Soja transgênica: sustentável? responsável?** 2010. Disponível em: <www.gmwatch.org/files/GMsoy_Sust_Respons_FULL_POR_v2.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2013.

BARBOSA-NETO, J. F.; SORRELLS, M. E.; CISAR, G. Prediction of heterosis in wheat using coefficient of parentage and RFLP-based estimates of genetics relationship. **Genome**, Ottawa, v. 39, n. 6, p. 1142-1149, 1996.

BARROS, H. B.; SILVA, A. A.; SEDIYAMA, T. Manejo de plantas daninhas In: SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecnas, 2009. cap. 10, p. 101-117.

BENCHIMOL, L. L.; CAMPOS, T.; CARBONELL, S. A. M.; COLOMBO, C. A.; CHIORATO, A. F.; FORMIGHIERI, E. F.; SOUZA, A. P. Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 54, p. 1747-1762, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10722-006-9184-3>>.

BENITEZ, L. C.; RODRIGUES, I. C. S.; ARGE, L. W. P.; RIBEIRO, M. V.; BRAGA, E. J. B. Análise multivariada da divergência genética de genótipos de arroz sob estresse salino durante a fase vegetativa. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 409-416, 2011.

BERTAGNOLLI, C. M.; TILLMANN, M. A. A.; VILLELA, F. A. Sistema hidropônico com uso de solução de herbicida na detecção de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 182-192, 2006.

BERTINI, C. H. M.; ALMEIDA, W. S.; SILVA, A. P. M.; SILVA, J. W. L.; TEÓFILO, E. M. Análise multivariada e índice de seleção na identificação de genótipos superiores de feijão-caupi. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 613-619, 2010.

BONATO, A. L. V.; CALVO, E. S.; GERALDI, I. O.; ARIAS, C. A. A. Genetic similarity among soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars released in Brazil using AFLP markers. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 692-704, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572006000400019>>.

BONNY, S. Success factors, issues and prospects for the first GM crops: the case of Roundup Ready[®] soybean in the USA. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PUBLIC GOODS AND PUBLIC POLICY FOR AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY, 7.; INTERNATIONAL CONSORTIUM ON AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY RESEARCH (ICABR), 2003, Ravello, Italy.

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

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**, Boston, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2009. p. 11-93.

CARPENTER, J. E. **Estudos de caso em benefícios e riscos de biotecnologia na agricultura: Soja Roundup Ready e milho Bt**: boletim. Washington: Centro Nacional de Alimentos e Política de Agricultura, 2001. p. 1-48.

CARVALHO, L. P.; LANZA, M. A.; FALLIERI, J.; SANTOS, J. W. Análise da diversidade genética entre acessos de banco ativo de germoplasma de algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 10, p. 1149-1155, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2003001000003>>.

CAVALIERI, S. D.; VELINI, E. D.; SILVA, F. M. L.; ANDRADE, G. J. M. Acúmulo de nutrientes e matéria seca na parte aérea de dois cultivares de soja RR sob efeito de formulações de glyphosate. **Planta Daninha**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 349-358, 2012.

CÉLERES. **2º acompanhamento de adoção da biotecnologia agrícola para a safra 2012/13**. 2012. p. 7. Disponível em: <www.celeres.com.br/post.php?p=62&lang=pt>. Acesso em: 12 dez. 2012.

CHARCOSSET, A.; LEFORT-BUSON, M., GALLAIS, A. Relationship between heterosis and heterosigosity at marker loci: A theoretical computation. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 81, p. 571-575, 1991.

CHIORATO, A. F.; CARBONELL, S. A. M.; BENCHIMOL, L. L.; CHIAVEGATO, M. B.; DIAS, L. A. S.; COLOMBO, C. A. Genetic diversity in common bean accessions evaluated by means of morpho-agronomical and RAPD data. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 3, p. 256-262, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162007000300007>>.

CHUNG, G.; SINGH, R. J. Broadening the genetic base of soybean: a multidisciplinary approach. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 27, n. 5, p. 295-341, 2008.

CIB. Conselho De Informação Sobre Biotecnologia. **Perguntas e Respostas: Legislação**. Disponível em: <<http://cib.org.br/biotec-de-a-a-z/perguntas-e-respostas/legislacao/>>. Acesso em: 20 fev. 2013.

COELHO, A. S. G. **Bood**: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variado de marcadores (software). Goiânia: UFG, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Vegetal, 2002.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos safra 2011/2012, décimo segundo levantamento, setembro/2012**. Brasília, 2012. 30 p. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=>>. Acesso em: 12 dez. 2012.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos safra 2012/2013, sexto levantamento, março/2013**. Brasília, 2013. 25 p. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

CORREIA, N. M.; REZENDE, P. M. **Manejo integrado de plantas daninhas na cultura da soja**. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/Boletim/pdf/bol_51.pdf>. Acesso em: 24 jul. 2008.

CREGAN, P. B.; JARVIK, T.; BUSH, A. L.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; KAHLER, A. L.; KAYA, N.; VANTOAI, T. T.; LOHNES, D. G.; CHUNG, J.; SPECHT, J. E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 5, p. 1464-1490, 1999.

CRUZ, C. D. **Programa genes: análise multivariada e simulação**. Viçosa: UFV, 2006. 175 p.

CRUZ, C. D. **Programa genes: diversidade genética**. Editora UFV. Viçosa, 2008. 278 p.

CRUZ C. D.; REGAZZI A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV. 2001. 390 p.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. 620 p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2004. v. 1.

CUI, Z.; CARTER JR., T. E.; BURTON, J. W.; WELLS, R. Phenotypic diversity of modern chinese and North american soybean cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 1954-1967, 2001.

DALL'AGNOL, A. Sem medo de competir. **Agroanalysis**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 42-43, 2002.

DELLAGOSTIN, M.; HENNING, F. A.; MERTZ, L. M.; KOPP, M. M.; CRESTANI, M.; SCHUSTER, I.; ZIMMER, P.D. Dissimilaridade genética em população segregante de soja com variabilidade para caracteres morfológicos de semente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 689-698, 2011.

DIAS, L. A. S. **Divergência genética e fenética multivariada na predição de híbridos e preservação de germoplasma de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. 1994. 94 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y.; CASTRO, G. C. Divergência fenética multivariada na preservação de germoplasma de cacau (*Theobroma cacao* L.). **Agrotropica**, Itabuna, v. 9, n. 1, p. 29-40, 1997.

DINIZ-FILHO, J. A. F. **Métodos filogenéticos comparativos**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 120.

DOLDI, M. L.; VOLLMANN, J.; LELLEY, T. Genetic diversity in soybean as determined by RAPD and microsatellite analysis. **Plant Breeding**, Berlin, v. 116, n. 4, p. 331-335, 1997.

DORNELES, L. M. C.; REZENDE, D. F.; SOUSA, L. B.de; HAMAWAKI, O. T. Diversidade genética entre linhagens de soja semiprecoce no município de goiatuba-GO, safra 2009/2010. **Revista Verde**, Mossoró, v. 6, n. 1, p. 22-27, 2011.

DOTTO, M. A.; AFFÉRI, F. S.; PELUZIO, J. M.; MELO, A. V.; CARVALHO, E. V. Divergência genética entre cultivares comerciais de milho em baixas altitudes no Tocantins, safra 2007/2008. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 41, n. 4, p. 630-637, 2010.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema de produção 13: Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil 2009 e 2010**. Londrina: EMBRAPA SOJA, 2011. 262 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FONSECA, A. F. A. da; SEDIYAMA, T.; CRUZ, C. D.; SAKAIYAMA, N. S.; FERRÃO, M. A. G.; FERRÃO, R. G.; BRAGANÇA, S. M. Divergência genética em café conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 4, p. 599-605, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006000400008>>.

FRANCO, M. C.; CASSINI, S. T. A.; OLIVEIRA, V. R.; TSAI, S. M. Caracterização da diversidade genética em feijão por meio de marcadores RAPD. Brasília. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 381-385, 2001.

FU, Y-B. Impact of plant breeding on genetic diversity of agricultural crops: searching for molecular evidence. **Plant Genetic Resources**, Maccaresse, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1079/PGR2006116>>.

GAZZIERO, D. L. P.; PRETE, C. E. C. Resistência é a questão. **Revista Cultivar**, Pelotas, v. 6, n. 60, p. 22-24, 2004.

GAZZIERO, D. L. P.; ADEGAS, F. S.; VOLL, E. **Indicações para o uso de glyphosate em soja transgênica**. Londrina: Embrapa, 2007. 4 p.(Circular Técnica, 49).

GAZZIERO, D. L. P.; ADEGAS, F.; VOLL, E. Glifosate e a soja transgênica. Londrina: Embrapa-CNPSO, 2008. 4 p. (Circular Técnica, 60).

GAZZIERO, D. L. P.; KARAM, D.; VOLL, E.; VALL, W. C.; YORINORI, J. T.; CORREA, B. S. Biologia e manejo integrado de plantas daninhas na cultura da soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 22., 1994, Cruz Alta, RS. **Resumos...** Cruz Alta: [s.n.], 1994. p. 81.

GIZLICE, Z.; CARTER, T. E.; BURTON, J.W. Genetic diversity in North American soybean: I. Multivariate analysis of founding stock and relation of coefficient of parentage. **Crop Science**, Madison, v.33, n. 3, p. 614-620, 1993.

GOUVÊA, L. R. L.; RUBIANO, L. B.; CHIORATO, A. F.; ZUCHI, M. I.; GONÇALVES, P. S. Genetic divergence of rubber tree estimated by multivariate techniques and microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 2, p. 308-318, 2010.

GREEN, J. M. Evolution of glyphosate-resistant crop technology. **Weed Science**, Lawrence, v. 57, n. 1, p. 108-117, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1614/WS-08-030.1>>.

HIROMOTO, D. M.; VELLO, N. A. The genetic base of Brazilian soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 2, p. 295-306, 1986.

HYMOWITZ, T. Speciation and cytogenetics. In: BOERMA, H.R.; SPECHT, J. E. (Ed.). **Soybeans**: improvement, production and uses. 4th. ed. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America, 2004. chap. 4, p. 97-136.

HYMOWITZ, T.; SINGH, R. J.; KOLLIPARA, K. P. Biosystematics of the genus *Glycine*, 1996. **Soybean Genetics Newsletter**, Baltimore, v. 24, p. 119-120, 1997.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola. 2012.** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>>. Acesso em: 26 fev. 2012.

KATTI, M. V.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, V. S. Differential Distribution of Simple Sequence Repeats in Eukaryotic Genome Sequences. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 18, n. 7, p. 1161-1167, 2001.

KEIM, P.; BEAVIS, W.; SCHUPP, J.; FREESTONE, R. Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 85, p. 205–212, 1992.

LABORDA, P. R.; OLIVEIRA, K. M.; GARCIA, A. A. F.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; SOUZA, A. P. Tropical maize germplasm: what can we say about its genetic diversity in the light of molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 111, p. 1288-1299, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00122-005-0055-7>>.

LEITÃO, F. O.; MEDEIROS, J. X.; THOMÉ, K. M.; CARVALHO, J. M.; BRISOLA, M. V. Cultivo de soja transgênica no estado de Mato Grosso: fatores propulsores e limitativos. **Revista de Economia Agrícola**, São Paulo, v. 57, n. 1, p. 61-74, 2010.

LI, W.; HAN, Y.; ZHANG, D.; YANG, M.; TENG, W.; JIANG, Z.; QIU, L.; SUN, G. Genetic diversity in soybean genotypes from north-eastern China and identification of candidate markers associated with maturity rating. **Plant Breeding**, Berlin, v. 127, p. 494-500, 2008.

LIU, M.; ZHANG, M.; JIANG, W.; SUN, G.; ZHAO, H.; HU, S. Genetic diversity of Shaanxi soybean landraces based on agronomic traits and SSR markers. **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v. 10, n. 24, p. 4823-4837, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJB10.2272>>.

LUTHY, J. Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. **Food Control**, Oxford, v. 10, p. 359-361, 1999.

MALIK, F. M. A.; QURESHI, A. S; ASHRAF, M.; KHAN, M. R; JAVED, A. Evaluation of genetic diversity in soybean (*Glycine max*) lines using seed protein electrophoresis. **Australian Journal of Crop Science**, Faisalabad, v. 3, p. 107-112, 2009.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de sementes e mudas. Registro Nacional de Cultivares (RNC): lei 10.711, de 05 de agosto de 2003, decreto nº.153, de julho de 2004. Brasília : CSM/DFIA/SDA, 2013. Disponível em: www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/registro/registro-nacional-cultivares>. Acesso em: 20 fev. 2013.

MARTIN, M. S. Crop strength through diversity. **Nature**, London, v. 406, p. 681-682, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/35021152>>.

MELGAREJO, L. Safra transgênica de 2002/2003. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 1, n. 1, p. 229-232, 2006.

MENEGATTI, A. L. A.; BARROS, A. L. M. Análise comparativa dos custos de produção entre soja transgênica e convencional: um estudo de caso para o Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Brasília, v. 45, n. 1, p. 163-183, 2007.

MIN, W.; RUN-ZHI, L.; WAN-MING, Y.; WEI-JUN, D. Assessing the genetic diversity of cultivars and wild soybeans using SSR markers. **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v. 9, n. 31, p. 4857-4866, 2010.

MIRANDA, D. M.; TILLMANN, M. A. A.; BALERINI, F.; VILLELA, F. A. Bioensaios na detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 93-103, 2005.

MIRANDA, Z. F. S.; ARIAS, C. A. A.; KIHLE, R. A. S.; ALMEIDA, L. A. A.; TOLEDO, J. F. F. de; DESTRO, D. Genetic characterization of ninety elite soybean cultivars using coefficient of parentage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 363-396, 2007.

MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p.1062.

MONQUERO, P. A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 4, p. 517-531, 2005.

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

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

NOGUEIRA, A. P. O. **Correlações entre caracteres, análises de trilha e diversidade fenotípica e molecular em soja**. 2011. 126 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

ODA, M. C. **Adaptabilidade de produção e análise molecular, genealógica e morfológica de cultivares de soja**. 2007. 89 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCovsky, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

PADGETTE, S. R.; KOLACZ, K. H.; DELANNAY, X.; RE, D. B.; LAVALLEE, B. J.; TINIUS, C.; RHODES, W. K.; OTERO, Y. I.; BARRY, G. F.; EICHHOLTZ, D. A.; PESCHKE, V. M.; NIDA, D. L.; TAYLOR, N. B.; KISHORE, G. M. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 1451–1461, 1995.

PELUZIO, J. M.; VAZ-DE-MELO, A.; AFFÉRI, F. S.; SILVA, R. R.; BARROS, H. B.; NASCIMENTO, I. R.; FIDELIS, R. R. Variabilidade genética entre cultivares de soja, sob diferentes condições edafoclimáticas. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, Guarapuava, v. 2, n. 3, p. 21-29, 2009.

PELUZIO, J. M.; PIRES, L. P. M.; CANCELLIER, L. L.; AFFÉRI, F. S.; COLOMBO, G. A.; TEIXEIRA JÚNIOR, T.; RIBEIRO, G. R. S. Genetic divergence among soybean cultivars in irrigated lowland in the State of Tocantins. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 3, p. 395-400, 2012.

PIONEER. Pioneer responde. **Edição Especial**, 2006. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/InfoTecDownloadDetalhe.aspx?Id=63>>. Acesso em: 10 maio 2011.

PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JÚNIOR, C. T.; ARANTES, N. E.; CONTEL, E. P. B. Characterization of brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 185-193, 2002.

PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JÚNIOR, C. T.; SOUSA, S. M. B.; SOUSA, N. E. A.; CONTEL, E. P. B. Diversidade genética da soja entre períodos e entre programas de melhoramento no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 10, p. 967-975, 2004.

PRIOLLI, R. H. G.; PINHEIRO, J. B.; ZUCCHI, M. I.; BAJAY, M. M.; VELLO, N. A. Genetic diversity among Brazilian soybean cultivars based on SSR loci and pedigree data. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 3, p. 519-531, 2010.

RE, D. B.; PADGETTE, S. R.; DELANNAY, X.; KOLACZ, K.; NIDA, D. L.; PESCHKE, V. M.; DERTING, C. W.; ROGERS, S. G.; EDWARDS, J. W.; BARRY, G. F. E.; BIEST, N. A. **Petição para a determinação de status não-regulamentado**: soja com um Gene Roundup Ready. apresentada ao Departamento de Agricultura-APHIS pela Companhia Monsanto. St. Louis, Missouri, 1993.

RIGON, J. P. G.; CAPUANI, S.; BRITO NETO, J. F.; ROSA, G. M.; WASTOWSKI, A. D.; RIGON, C. A. G. Dissimilaridade genética e análise de trilha de cultivares de soja avaliada por meio de descritores quantitativos. **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p. 233-240, 2012.

ROESSING, A. C.; GUEDES, L. C. A. Aspectos econômicos do complexo soja: sua participação na economia brasileira e evolução na região do Brasil central. In: ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. M. (Ed.). **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1993. p. 1-70.

ROLDÁN-RUIZ, I.; EUWIJK, F. A. van; GILLILAND, T. J.; DUBREUIL, P.; DILLMANN, C.; LALLEMAND, J.; LOOSE, M. de; BARIL, C. P. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. **Theoretical Applied Genetics**, Heidelberg, v. 103, p. 1138-1150, 2001.

SALIMI, S.; LAHIJI, H. S.; ABADI, G. M.; SALIMI, S.; MORADI, S. Genetic diversity in soybean genotypes under drought stress condition using factor analysis and cluster analysis. **World Applied Sciences Journal**, Dubai, v. 16, n. 4, p. 474-478, 2012.

SANTOS, E. R.; BARROS, H. B.; FERRAZ, E. C.; CELLA, A. J. S.; CAPONE, A.; SANTOS, A. F.; FIDELIS, R. R. Divergência entre genótipos de soja, cultivados em várzea irrigada. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, p. 755-764, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2011000600012>>.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; BARROS, H. B. Origem, evolução e importância econômica. In: SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecenas, 2009. cap. 1, p. 1-5.

SHADAKSHARI, T. V.; KALAIMAGAL, T.; SENTHIL, N.; BORANAYAKA, M. B.; KAMBE GOWDA, R.; RAJESHA, G. Genetic diversity studies in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] based on morphological characters. **Asian Journal of Bio Science**, Tokyo, v. 6, n. 1, p. 7-1, 2011.

SINGH, S. P.; GUTIÉRREZ, J. A.; MOLINA, A.; URREA, C.; GEPTS, P. Genetic diversity in cultivated common beans: II. Markers based analysis of morphological and agronomic traits. Madison. **Crop Science**, Madison, v. 31, p. 23-29, 1991.

SINGH, R. K.; BHAT, K. V.; BHATIA, V. S.; MOHAPATRA, T.; SINGH, N. K. Association mapping for photoperiod insensitivity trait in soybean. **National Academy Science Letters**, Allahabad, v.31, n. 9-10, p. 281-283, 2008.

SINGH, R. K.; BHATIA, V. S.; BHAT, K. V.; MOHAPATRA, T.; SINGH, N. K.; BANSAL, K. C.; KOUNDAL, K. R. SSR and AFLP based genetic diversity of soybean germplasm differing in photoperiod sensitivity. **Genetics and Molecular Biology**, Rbeirão Preto, v. 33, n. 2, p. 319-324, 2010.

SNELLER, C. H. Impact of transgenic genotypes and subdivision on diversity within elite North American soybean. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 409-414, 2003.

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 soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 109, n. 1, p. 122-128, 2004.

STATSOFT. **STATISTICA**: (data analysis software system), version 7. 2004. Disponível em: <www.statsoft.com>.

TANTASAWAT, P.; TRONGCHUEN, J.; PRAJONGJAI, T.; JENWEERAWAT, S.; CHAOWISET, W. SSR analysis of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic relationship and variety identification in Thailand. **Australian Journal of Crop Science**, Faisalabad, v. 5, p. 283-290, 2011.

TATINENI, V.; CANTRELL, R. G.; DAVIS, D. D. Genetic diversity in elite cotton germplasms determined by morphological characteristics and RAPD. Madison. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 186-192, 1996.

TREZZI, M. M.; KRUSE, N. D.; VIDAL, R. A. Inibidores de EPSPs. In: VIDAL, R. A.; MEROTO JR., A. **Herbicidologia**. Porto Alegre, 2001. p. 37-45.

USDA. United States Department of Agriculture. World Agricultural Production. **Circular Series**: USDA. feb. 2013. Disponível em: <www.ntis.gov/products/specialty/usda/fas_a-g.asp>. Acesso em: 10 mar. 2013.

VIEIRA, E. A.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; BENIN, G.; ZIMMER, P. D.; SILVA, J. A. G.; MARTINS, A. F.; BERTAN, E.; SILVA, G. O.; SCHMIDT, D. A. M. Comparação entre medidas de distância genealógica, morfológica e molecular em aveia em experimentos com e sem a aplicação de fungicida. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 1, p. 51-60, 2005.

VIEIRA, E. S. N.; SCHUSTER, I.; SILVA, S. B.; OLIVEIRA, M. A. R. Variabilidade genética em cultivares de soja determinada com marcadores microssatélites em gel de agarose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1460-1466, 2009.

WANG, L. X.; GUAN, R. X.; LIU, Z. X.; CHANG, R. Z.; QIU, L. J. Genetic diversity of Chinese cultivated soybean revealed by SSR markers. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 1032–1038, 2006.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessemnet of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Maryland Heights, v. 31, part 2, p. 117-165, 2000.

WYSMIERSKI, P. T. **Contribuição genética dos ancestrais da soja às cultivares brasileiras**. 2010. 99 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

YAMANAKA, N.; SATO, H.; YANG, Z.; XU, D.H.; CATELLI, L.L.; BINNECK, E.; ARIAS, C. A. A.; ABDELNOOR, R. V.; NEPOMUCENO, A. L. Genetic relationships between Chinese, Japanese, and Brazilian soybean gene pools revealed by simple sequence repeat (SSR) markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 1, p. 85-88, 2007.

ZANCOPÉ, G. J.; NASSER, J. M. **O Brasil que deu certo: a saga da soja brasileira**. Curitiba: Tríade, 2005. p. 279.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.