

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE
JABOTICABAL**

**MAPEAMENTO DE QTL E ANÁLISES DE
ESPECTROSCOPIA PARA TEOR DE ÓLEO VISANDO
APLICAÇÃO EM PROGRAMAS DE MELHORAMENTO DE
SOJA**

Daniel Carvalho Leite
Engenheiro Agrônomo

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE
JABOTICABAL**

**MAPEAMENTO DE QTL E ANÁLISES DE
ESPECTROSCOPIA PARA TEOR DE ÓLEO VISANDO
APLICAÇÃO EM PROGRAMAS DE MELHORAMENTO DE
SOJA**

Daniel Carvalho Leite

Orientador: Profa. Dra. Sandra Helena Unêda-Trevisoli

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Orlando Di Mauro

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus
de Jaboticabal, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Genética e Melhoramento de
Plantas)**

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DANIEL CARVALHO LEITE – nascido em 26 de maio de 1981, na cidade de Itumbiara, Goiás. Em agosto de 1999 ingressou na Faculdade Dr. Francisco Maeda – FAFRAM – Ituverava, no Curso de Agronomia, graduando-se como Engenheiro Agrônomo em julho de 2004. Em agosto de 2007 iniciou o curso de mestrado Stricto Sensu em Agronomia, com Área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal - SP. Durante o período de realização do curso foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) obtendo o Título de Mestre em Fevereiro de 2010. Em março de 2011, nessa mesma Universidade, iniciou o curso de doutorado Stricto Sensu em Agronomia, na mesma área de concentração. Durante o período de realização do curso foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) obtendo o Título de Doutor em Fevereiro de 2015.

ORAÇÃO DA SERENIDADE

"Senhor, conceda-me serenidade para aceitar as coisas que não posso modificar, coragem para modificar aquelas que posso e sabedoria para distinguir uma das outras."

Dedicatória

A Deus, pois sem Ele nada seria possível

A minha família – “Porque família é assim, se cobrir vira circo e se cercar vira
hospício”

Pai, Mãe, Pri e Ana

pela força e compreensão em todos os momentos

desta e de outras caminhadas.

Amo vocês

AGRADECIMENTOS

À **Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Unêda Trevisoli** minha orientadora, pela receptividade, exemplo profissional e pessoa excepcional, pelos ensinamentos que transcenderam as exigências do seu papel e da sua responsabilidade e que, com certeza, balizarão a minha vida profissional futura.

Ao **Prof. Dr. Antonio Orlando Di Mauro** meu coorientador, pela acolhida, apoio, pela contribuição intelectual e exemplo profissional.

Ao **Departamento de Produção Vegetal** da FCAV/UNESP pelo uso da infraestrutura de suas dependências para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores da PG em especial **Prof Dr Rinaldo Cesar de Paula, Prof^a Dr^a Janete Aparecida Desidério, Prof^a Dr^a Sonia Marli Zingaretti, Prof^a Dr^a Maria Inês Tiraboschi Ferro, Prof^a Dr^a Eliana Gertrudes Macedo Lemos, Prof Dr José Roberto Moro, Prof Dr Gustavo Vitti Moro** por transmitirem o vasto conhecimento e ampla experiência em genética e melhoramento de plantas.

Ao **Prof Dr Antonio Sergio Ferraudo, Prof Dr Euclides Braga Malheiros e Prof Dr Rouverson Pereira da Silva** muito obrigado pela contribuição na minha formação acadêmica.

Aos meus ex-orientadores **Prof Dr Dilermando Perecin, Profa Dra Luciana Rossini Pinto e Profa Dra Anice Garcia** pela dedicação e orientação.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal cujos nomes e rostos se confundem na hora de agradecer, e em especial **Monica, Geraldo, Mauro, Sebastião, Faro, Tito e Faco** pela colaboração e amizade.

Aos membros participantes da banca de exame geral de qualificação: o **Prof. Dr. Gustavo Henrique de Almeida Teixeira**, a **Prof^a. Dr^a. Lucia Maria Saran**, a **Prof^a. Dr^a Andreia da Silva Meyer** e a **Prof^a Dr^a Viviane Formice Viana** pelas sugestões e disponibilidade.

Aos membros participantes da banca de defesa de tese de doutorado: o **Prof Dr. José Baldin Pinheiro**, a **Prof^a. Dr^a Andreia da Silva Meyer**, a **Prof^a Dr^a Viviane Formice Viana** e a **Prof^a Dr^a Cibele Chalita Martins** pelas considerações.

Ao **Prof. Dr. José Baldin Pinheiro** pelo apoio e parceria nas análises dos dados moleculares.

À **Jaqueline Bueno** aluna de mestrado e técnica do Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ/USP, pela obtenção dos dados moleculares. Jacki você é uma amiga e profissional exemplar.

Aos amigos de longa data do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas: **Eduardo, Wellington, Viviane, Mariana, Aretha, Roberta, José Arantes, Anderson, Otávia, Lilian, Fabiana, Livia, Elise, Bruno, Wallace, Alysson, Andrea, Renata, Mário, Rafael, Catarina, Ana Paula, Douglas, Amanda, Melina, Cleber e todos os estagiários**, obrigado pela companhia.

A todos os colegas do curso de pós-graduação pelos momentos, discussões compartilhadas e prazerosa convivência.

Aos meus amigos **Rafael Marani, Danilo Mello, Max, Fabiano Pirola, Vinicius Dantas, Bruno Vieira, Silviane, Otávia, Juliana Faria, Clíssia Barboza, Renata Gimenes, Gustavo Romani, Vanessa (Valéria), Marilena (Maria), Fabricio Zera, Ana Regina, Givanildo, Amanda, Lilian, João Boneti, Tarcisio, Camila e Lucas**, muito obrigado, sempre, por tudo, pela sólida amizade, carinho e apoio nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

Aos integrantes da **República Misto Quente – Jaboticabal, Andrea, Denise, Peterson e Aline**, vocês foram extraordinários e sem esquecer da cachorrada toda.

Aos amigos da República de Piracicaba que muito me acolheu **Juliana (Juu), Adriana (du bairro), Vitor (Roró) e Fábio**, obrigado pela acolhida e amizade sincera.

A grande amiga **Sônia** do Departamento de Biologia, obrigado pelo carinho, preocupação e apoio sempre nas horas em que mais precisei e que Deus te abençoe sempre.

A meus pais, na pessoa de **José Luiz Leite**, meu pai, guerreiro e amigo, cuja conduta não tem igual, a **Maria Aparecida**, minha mãe, incentivadora e companheira inigualável, minha irmã **Priscilla**, pela amizade e solidariedade e a minha “filha” **Ana Júlia** símbolo de pureza e ternura, por alegrar minha vida. Amo vocês.

A todos da minha família (tios, tias, primos e primas) em especial a minha Avó **Aparecida** sempre presente nos momentos mais precisos. “Vó Cida” a Senhora é excepcional.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), ao Programa de pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) (PG/GMP), pelo apoio e contribuição em minha formação profissional.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2011/00625-5) pelas bolsas DCI e DCII concedidas e auxílios financeiros.

A **Deus** por todas as oportunidades, saúde e alegria.

A todos que contribuíram de uma forma ou de outra para a realização deste trabalho, inclusive aos que me esqueci de mencionar.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xi
ABSTRACT	Xii
CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Importância da cultura da soja.....	3
2.2 Composição nutricional do grão de soja.....	5
2.3 Obtenção e produção do biodiesel.....	6
2.4 Precocidade visando rotação com cana-de-açúcar.....	8
2.5 Marcadores moleculares no melhoramento de plantas.....	9
2.6 Marcador molecular microssatélite.....	10
2.7 Seleção assistida por marcadores moleculares.....	11
2.8 Mapeamento de QTL's para teor de óleo.....	13
2.9 Espectroscopia por infravermelho próximo (NIR).....	14
3. REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 2: DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E TEOR DE ÓLEO EM SEMENTES DE SOJA POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)	20
RESUMO	20
1. INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1 Material vegetal.....	22
2.2 Obtenção dos espectros NIR.....	24
2.3 Determinação dos teores de umidade e óleo por métodos de referência.....	24
2.4 Pré-tratamentos dos espectros.....	25
2.5 Desenvolvimento dos modelos de calibração e validação.....	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3.1 Análise de composição do grão de soja.....	26
3.2 Espectros NIR e desenvolvimento dos modelos de calibração e validação.....	39
4. CONCLUSÃO	46
5. REFERÊNCIAS	47
CAPÍTULO 3: MAPEAMENTO DE QTL'S PARA ALTO TEOR DE ÓLEO EM POPULAÇÕES SEGREGANTES DE SOJA	49
RESUMO	49
1. INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1 Atividades em casa-de-vegetação.....	51
2.2 Atividades em campo.....	57
2.3 Atividades em laboratório.....	58
2.3.1 Extração e quantificação do DNA genômico.....	58
2.3.2 Análises moleculares em populações F ₁	58
2.3.3 BSA (<i>Bulked Segregant Analysis</i>).....	59
2.3.4 Análises moleculares em populações F ₂	60

2.4 Obtenção do conteúdo de informação polimórfica (PIC).....	60
2.5 Construção do mapa de ligação.....	61
2.6 Mapeamento de QTL's para teor de óleo.....	61
2.7 Obtenção do teor de óleo das progênies.....	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1 Identificação de hibridação por marcadores SSRs em progênies F_2 ...	62
3.2 Avaliação do polimorfismo de marcadores SSRs entre os genitores da população de mapeamento por meio de análise BSA.....	64
3.3 Conteúdo de informação polimórfica (PIC).....	66
3.4 Construção do mapa de ligação e análise de QTL's.....	67
4. CONCLUSÃO	71
5. REFERÊNCIAS	71

MAPEAMENTO DE QTL E ANÁLISES DE ESPECTROSCOPIA PARA TEOR DE ÓLEO VISANDO APLICAÇÃO EM PROGRAMAS DE MELHORAMENTO DE SOJA

RESUMO - A soja vem assumindo importância crescente em áreas canavieiras do Estado de São Paulo, como opção para cultivo em áreas de rotação/sucessão da cana-de-açúcar e para isso, faz-se necessário que o cultivar de soja possua ciclo curto, além de bons atributos agronômicos e alto teor de óleo visando a produção de biodiesel. O objetivo de presente trabalho foi a detecção e mapeamento de QTL's associados aos conteúdos de óleo na soja, em populações F_2 derivadas do cruzamento entre linhagens precoces e adaptadas ao sistema de rotação cana-soja (baixo teor de óleo) e genótipos não adaptados a este sistema (alto teor de óleo), visando a utilização de tais QTL's no processo seletivo de populações segregantes. Além disso, objetivou-se ainda a construção de uma curva de calibração para ser utilizada em leituras de teor de óleo por espectroscopia do infravermelho próximo (NIR), em programas de melhoramento de soja. O mapeamento de QTL's foi realizado por marcadores microssatélites (SSR) em população segregante de soja F_2 proveniente do cruzamento bi-parental entre a Linhagem 69 (baixo teor de óleo) e o cultivar Tucunaré (alto teor de óleo), onde as leituras de teor de óleo das progênes foram obtidas por NIR. Os modelos de espectroscopia utilizados apresentaram coeficientes de correlação e os erros quadrático médio (RMSEC) respectivamente, de 76% e 0,33 para umidade e 57% e 1,27 para óleo, indicando a viabilidade da metodologia NIR para predição dos parâmetros de umidade e teor de óleo em sementes de soja. Foram detectados dois QTLs associados ao conteúdo de óleo, nos grupos de ligação K e H. A variação fenotípica explicada pelos QTL variou de 7,8% a 46,75%, para o conteúdo de óleo. Foram detectados novos QTL associados ao conteúdo de óleo, divergindo daqueles previamente relatados em outros estudos.

Palavras-chave: marcador molecular, espectroscopia no infravermelho próximo, melhoramento genético

QTL MAPPING AND SPECTROSCOPY ANALYSIS FOR OIL CONTENT IN ORDER APPLICATION IN SOYBEAN BREEDING PROGRAMS

ABSTRACT - Soy has become increasingly important in sugarcane areas of São Paulo, as an option for cultivation in areas of rotation / succession of cane sugar and for this, it is necessary that the soybean cultivar has a short cycle, as well as good agronomic traits and high oil content in order to produce biodiesel. The aim of this study was the detection and QTL mapping associated with the soybean oil content in F2 populations derived from the cross between early lines and adapted to cane soybean rotation system (low oil content) and genotypes not adapted to this system (high oil content), to the use of such QTL in the selection of segregating populations. In addition, aimed to further the construction of a calibration curve for use in oil content readings by near infrared spectroscopy (NIR) in soybean breeding programs. The QTL mapping was performed by microsatellite markers (SSR) in segregating population from F2 soybean bi-parental cross between Line 69 (low) oil and cultivar Tucunaré (high oil content), where the content of readings oil progenies were obtained by NIR. The models used spectroscopy showed correlation coefficients and root mean square errors (RMSEC) respectively, and 0.33 to 76% moisture and 57% oil and 1.27 for indicating the feasibility of NIR method for predicting the moisture parameters and oil content in soybean seeds. Two QTLs were detected associated with the oil content in linking groups K and H. The phenotypic variation explained by QTLs varied from 7.8% to 46.75%, for oil content. New QTL was associated with the oil content, unlike those previously reported in other studies.

Keywords: molecular marker, near infrared spectroscopy, breeding

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja constitui-se na principal oleaginosa cultivada dentre as espécies graníferas. A soja é considerada a principal *commodity* comercializada no Mundo com produção mundial de 283,8 milhões de toneladas e uma área cultivada de 113 milhões de hectares. Entre os grandes produtores do grão, os Estados Unidos é considerado o maior produtor de soja com produção de aproximadamente 93 milhões de toneladas e com área cultivada de 32 milhões de hectares, sendo o Brasil o segundo maior produtor do grão (USDA, 2014).

No Brasil a safra de soja no ano agrícola 2014/15 está estimada em 92,4 milhões de toneladas em uma área total cultivada de 31 milhões de hectares, ocasionando em uma produtividade média aproximadamente de 3.000 kg/ha, consolidando o país como o segundo maior produtor e exportador mundial. Os Estados de Mato Grosso e Paraná são os principais produtores dessa cultura, contribuindo com 27% e 20 % respectivamente na produção nacional (CONAB, 2014).

De acordo com Teixeira (2006), a soja representa 88% do total da produção de oleaginosas e pelo seu parque industrial instalado, é sem dúvida a principal *commodity* nacional disponível para atender demandas crescentes por biodiesel, vindas, sobretudo, dos mercados americano e europeu.

A soja é uma das principais *commodities* comercializadas a nível mundial, não somente pela sua importância econômica, mas também pelo seu valor nutricional e sua composição. Essa cultura está inserida em diversas finalidades, seja na alimentação humana na forma de grãos inteiros e também em seus subprodutos como óleo vegetal, constituinte importante na formulação de ração animal, produção de biodiesel, entre outros (MANARA, 1998).

Além do sistema de monocultivo tradicional, a soja vem assumindo importância crescente em áreas canavieiras do Estado de São Paulo, como opção para cultivo em áreas de reforma. Entre as vantagens, pode-se citar: cultivo totalmente mecanizado, diversificação econômica e melhoria das características

químicas do solo, além dos benefícios ligados aos aspectos rotacionais e de fertilidade do solo (MAURO et al., 1999).

Diversos genótipos de soja são cultivados em diferentes ambientes de produção (clima e solo) com elevadas produções do grão, permitindo a quebra de fronteiras agrícolas, devido aos inúmeros programas de melhoramento genético existentes que visam selecionar genótipos não somente resistentes às principais pragas e doenças, mas também genótipos específicos direcionados para cada região.

Geneticamente, a soja possui uma base genética estreita, sendo considerada uma espécie autógama perfeita, por apresentar o mecanismo de cleistogamia. Para que ocorra a variabilidade genética, hibridações artificiais são efetuadas em genótipos preferencialmente divergentes.

Para que ocorra o sucesso nos programas de melhoramento genético de soja, são utilizadas inúmeras estratégias e conhecimento científico de qualidade para obtenção de genótipos altamente produtivos. Dessa forma, a avaliação dos caracteres agromorfológicos tais como: altura da planta, número de vagens, número de nós, entre outros, são avaliados em sucessivos ensaios de seleção, de forma que não ocorra a destruição do material vegetal para o avanço da geração futura.

O teor de óleo em grão de soja também é um outro caráter que visa a seleção de genótipos de soja. Tem como finalidade obtenção de genótipos com alto teor de óleo para a produção de biodiesel, bem como a obtenção de genótipos com tal caráter e que seja de ciclo precoce para atender a demanda de áreas de reforma de cana-de-açúcar, principalmente para o Estado de São Paulo.

Aliado a isso, não somente esses caracteres, mas também o tipo de delineamento estatístico utilizado nos ensaios experimentais é bastante criterioso para que diminua o efeito ambiental nos genótipos a serem avaliados.

Com o avanço dos programas de melhoramento genético, outras técnicas foram atribuídas na seleção de genótipos superiores tais como; a biotecnologia com o uso de marcadores moleculares bem como a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR).

O uso dos marcadores moleculares no melhoramento de plantas visa a seleção de genótipos ao nível de DNA, auxiliando em diversos estudos: diversidade

genética, mapeamento genético de QTL's, identificação varietal, *fingerprinting*, entre outros. Existem diversos tipos de marcadores moleculares, os quais são classificados quanto a sua natureza em dominantes e codominantes. De forma geral, estudos realizados com marcadores moleculares visam diminuir o tempo de seleção nos programas de melhoramento genético tradicional (MARTINS et al., 2011).

Outra técnica utilizada nos programas de melhoramento é a espectroscopia no infravermelho próximo que visa a avaliação da composição do grão de soja como teor de umidade, teor de óleo, proteína, cinzas bem como toda a fração de ácidos graxos. Esta técnica tem sido utilizada em fases iniciais de programas de melhoramento, por meio da avaliação dos genótipos para vários caracteres, sem a destruição das sementes, permitindo a condução dos mesmos às gerações futuras.

Mediante tais fatos, o presente estudo possui como objetivos a detecção e mapeamento de QTLs associados aos conteúdos de óleo na soja, em populações F_2 derivadas do cruzamento entre linhagens precoces e adaptadas ao sistema de rotação cana-soja (baixo teor de óleo) e genótipos não adaptados a este sistema (alto teor de óleo), visando a utilização de tais QTLs no processo seletivo de populações segregantes. Além disso, objetivou-se ainda a construção de uma curva de calibração para ser utilizada em leituras de teor de óleo por espectroscopia do infravermelho próximo (NIR), em programas de melhoramento de soja.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da cultura da soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), pertencente à família Fabaceae, é a mais importante leguminosa cultivada em nível mundial, tanto do ponto de vista econômico, como no aspecto nutricional. Originária da China, a cultura é utilizada na alimentação deste povo há mais de 5000 anos. Foi inicialmente cultivada no Brasil a partir de 1882, no entanto, apenas no final da década de 1960 tornou-se economicamente importante quando a produção passou de 203 mil toneladas em 1960 para 1 milhão de toneladas em 1969, na região Sul do país onde as condições climáticas de cultivo eram semelhantes às regiões tradicionais do restante do

mundo. Atualmente consolida-se como a mais importante cultura do agronegócio brasileiro. (CARUSO, 1996; CÂMARA, 2006).

Um levantamento de safra realizado pela Conab retrata um crescimento de 7% na área cultivada. O óleo vegetal proveniente do esmagamento deve ser destinado a atender a demanda adicional gerada pelo aumento, de 4% para 5% da mistura de óleo vegetal ao diesel mineral no âmbito do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel – PNPB (CONAB, 2014).

A soja é considerada, mundialmente, a principal fonte de produção de óleos e proteínas vegetais para alimentação humana e animal (MANARA, 1988), ocupando lugar de destaque na oferta de óleo para consumo interno, na alimentação animal como principal fonte protéica, bem como, na pauta de exportação do país (SEDIYAMA et al., 1993).

A soja pode ser utilizada na alimentação humana na forma de grãos inteiros, leite e molho. O óleo de soja é rico em ácidos graxos poli-insaturados podendo ser usado como óleo de cozinha e para produção de maionese e margarinas. O óleo também apresenta aplicações industriais na fabricação de tinta de caneta, biodiesel, tinta de pintura em geral, xampu, sabões e detergentes.

A lecitina obtida pela extração da goma do óleo de soja bruto é empregada como emulsificador na produção de produtos ricos em gorduras e óleos, como o chocolate, a margarina e os produtos de panificação. Pode também ser usada como agente estabilizador em banhas e como agente umectante para, por exemplo, cosméticos.

O farelo de soja é usado como suplemento alimentar rico em proteína para alimentação de gado, suínos, aves domésticas e peixes. A farinha e o concentrado de soja são utilizados em rações animais especiais. Na indústria alimentar, a soja pode ser utilizada na produção de cereais, pães, biscoitos, massas, produtos finos de carne etc. Usa-se a proteína texturizada de soja como substituto da carne. Os usos técnicos dos ingredientes proteicos e da farinha de soja incluem revestimentos de papel e auxiliares de processos de fermentação.

A casca da soja é retirada durante o descascamento inicial dos grãos e contém material fibroso. É usada como forragem grossa e também como fonte de fibras dietéticas de cereais matinais e de certos lanches prontos (MISSÃO, 2006).

2.2 Composição do grão de soja

O grão de soja é composto por aproximadamente 38% de proteínas, 19% de óleos, 27% de carboidratos e 11% de umidade (EMBRAPA, 2010). O óleo de soja é constituído de triacilgliceróis, que são ésteres formados a partir de três ácidos graxos e uma molécula de glicerol. Os ácidos graxos são ácidos orgânicos lineares que diferem pelo número de carbonos e também, pela presença de insaturações, isto é, duplas ligações entre os átomos de carbono, em sua cadeia hidrofóbica. Os ácidos graxos sem duplas ligações são conhecidos como saturados e aqueles que possuem tais ligações são chamados de insaturados ou poliinsaturados, com uma ou mais duplas ligações, respectivamente (CAMARA, 2006).

Na soja os principais ácidos graxos da fração óleo e a proporção média encontradas são: 11% de palmítico (C16:0), 4% de esteárico (C18:0), 23,4 % oléico (C 18:1), 53,2 % de linoléico (C18:2) e de 7,8% linolênico (C18:3) (LIU; WHITE, 1992). Outros ácidos como mirístico, palmitoléico, araquídico, eicosenóico e Behênico estão em menor quantidade. Estudos realizados por Lago et al. (1978) em vários genótipos, identificaram conteúdos médios de 15% de ácidos graxos saturados (11% a 13% de C16:0 e entre 3% a 4% de C18:0), 21% a 41% de ácidos graxos monoinstaurados (C18:1), entre 39% a 56% de ácidos di-insaturados (C18:2) e 4,5% a 6,9% de polinsaturados (C18:3).

A qualidade do óleo é determinada pela composição e distribuição destes ácidos graxos na molécula de triacilglicerol, influenciando suas propriedades físicas e químicas, como o ponto de fusão e a estabilidade oxidativa.

A degradação oxidativa de ácidos graxos polinsaturados, como o ácido linolênico ocorre pela presença de duplas ligações nas cadeias de carbonos, tornando estas moléculas suscetíveis ao ataque oxidativo, ocorrendo assim a formação de compostos que alteram o odor e sabor do produto (DUNTON et al., 1951; YADAV, 1996)

Dessa forma, o alto teor de ácidos graxos polinsaturados é responsável pela redução da estabilidade à oxidação e da qualidade do óleo de soja, tanto para fins alimentícios quanto industriais como, por exemplo, para a produção do biodiesel

(ALONSO; MAROTO, 2000). O ácido oléico não é estável como os ácidos graxos saturados, entretanto, é cerca de 10 vezes mais estável que o ácido linoléico e pelo menos 20 vezes mais estável que o ácido linolênico (ECONOMIC, 1990).

De acordo com Fehr (2007) citado em Matta (2008), alterações na composição dos ácidos graxos de óleo de soja têm sido bem sucedidas para melhor satisfazer as necessidades dos consumidores. O desejável seria que os óleos de soja comercializados possuíssem três modificações que são: redução de 8 para 1% do conteúdo de ácido linolênico da semente de soja; aumento do ácido oléico de 25 para 80%; e redução de 11 para 4% do conteúdo de ácido palmítico. Essas alterações são bastante benéficas visto que aumentam a estabilidade oxidativa e a vida útil do óleo, reduzindo a hidrogenação química e os teores de gorduras saturadas.

Os programas de melhoramento genético, buscam nos bancos de germoplasma da soja, genótipos com baixos teores de ácido linolênico. Foram identificadas introduções de plantas com teores mais baixos desse ácido, comparadas às cultivares elites, porém nenhuma delas com menos que 4% (KLEIMAN; CALVIS, 1982).

2.3 Obtenção e produção do Biodiesel

A demanda projetada de energia no mundo aumentará 1,7% ao ano, de 2000 a 2030, quando alcançará 15,3 bilhões de toneladas equivalentes de petróleo. Os combustíveis fósseis responderiam por 90% do aumento mundial, até 2030. Entretanto, o esgotamento progressivo das reservas mundiais de petróleo é uma realidade cada vez menos contestada. A Bristish Petroleum, em seu estudo “Revisão Estatística de Energia Mundial de 2004”, afirma que atualmente as reservas mundiais de petróleo durariam em torno de 41 anos, as de gás natural, 67 anos, e as reservas brasileiras de petróleo, 18 anos. (MAPA, 2010).

Há ainda os fatores ambientais, devido aos impactos negativos dos combustíveis fósseis sobre o clima. Para cada 3,8 litros de gasolina que um automóvel queima, são liberados 10 kg de CO₂ na atmosfera. A queima de

derivados de petróleo contribui para o aquecimento do clima global por elevar tais níveis de CO₂ na atmosfera. (BIODIESEL, 2010).

O Biodiesel vem sendo estudado como uma alternativa aos combustíveis derivados do petróleo, pois é um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis. A agricultura apresenta-se como uma alternativa viável, do ponto de vista econômico, social e ambiental, para a geração dessa energia renovável. O biodiesel pode ser produzido a partir de óleos vegetais, tais como soja, mamona, dendê (palma), girassol, babaçu, amendoim e pinhão manso.

A soja pode ser utilizada como uma das opções para obtenção de biocombustíveis. Por apresentar baixos custos de produção, encontra-se adaptada a todo território nacional, possui elevados teores de óleo, alta produtividade de óleo por hectare, podendo ainda ser armazenada por longos períodos. O biodiesel feito com óleo de soja não apresenta qualquer restrição para consumo em climas quentes ou frios. Seu óleo pode ser utilizado tanto para o consumo humano, quanto para produzir biodiesel ou para usos na indústria química.

Um óleo adequado para a produção do biodiesel deve ser rico em ácidos graxos de cadeia longa e com baixo nível de insaturação. Tais características determinam a estabilidade do produto (PINTO et al., 2005). O biodiesel pode ser produzido a partir do processo de transesterificação. Esse processo se dá pela reação do triglicerídeo com um álcool na presença de um catalisador, que pode ser um ácido ou uma base forte, produzindo uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos e glicerol. A mistura de ésteres é, então, separada e purificada e, assim, se tem o biodiesel. A fonte de álcool pode ser o metanol, o etanol, o propanol ou o butanol. Os mais utilizados são metanol e etanol, sendo que com o primeiro pode-se obter maior rendimento (MONTEIRO et al., 2005).

O metanol é geralmente empregado na produção de biodiesel devido à simplicidade do processo, ou seja, tempo de reação reduzido, separação espontânea da glicerina dos ésteres metílicos e alta conversão dos triacilglicerídeos em ésteres. Além disso, tem um custo menor e é utilizado em pequeno excesso no processo. Entretanto, apresenta algumas desvantagens: alta toxicidade, sintetizado de fontes não renováveis e o país não têm auto-suficiência na sua produção. O uso do etanol, mesmo com as suas desvantagens técnicas (separação difícil do

biodiesel/glicerina) e econômicas (alto custo) torna-se atrativo, sob o ponto de vista estratégico e ambiental. No Brasil, o uso de etanol é vantajoso, pois este é produzido em larga escala, constitui-se numa fonte de energia renovável (cana-de-açúcar) e abundante e, ainda, é obtido por processo totalmente independente do petróleo (FERRARI et al., 2005).

A viscosidade do biodiesel de soja a 37,8°C é de 4,08 quando obtido por metanólise (Me) e 4,41 por etanólise (Et) se aproximando dos valores encontrados no diesel oriundo do petróleo que varia entre 2,5 a 5,5. Já a viscosidade na mamona é de 17,02 por Me e 19,75 por Et; no dendê esses valores são de 6,25 por Me e 6,39 por Et. Com relação a densidade do biodiesel a 20°C os valores obtidos quando se utiliza metanol é de 0,884 para a soja, 0,9144 para a mamona e 0,8603 para o dendê. Ao empregar o etanol a densidade da soja é de 0,881, da mamona 0,9095 e do dendê 0,8597. Os valores do Biodiesel oriundo da soja nesta situação são novamente muito próximos ao do diesel, estando entre 0,820 a 0,880.

2.4 Precocidade visando rotação com cana-de-açúcar

A soja possui grande importância em áreas canavieiras do Estado de São Paulo, como opção para cultivo em áreas de reforma. Entre as vantagens, pode-se citar: cultivo totalmente mecanizado, diversificação econômica e melhoria das características químicas do solo. Devido ao seu excelente comportamento nessas áreas, além das vantagens citadas pode-se mencionar os benefícios dos aspectos rotacionais e de recuperação da fertilidade do solo (MAURO et al., 1999).

Em áreas de reforma de canavial tem-se optado pelo plantio de leguminosas por proporcionar ao produtor de cana uma série de vantagens sob o ponto de vista agrônomo, econômico, político e social (MONTEIRO; FERREIRA, 1986). As leguminosas vêm sendo preferidas por fixarem nitrogênio atmosférico, por possuírem uma estreita relação carbono: nitrogênio e por deixarem no solo, após a colheita, um resíduo vegetal facilmente decomponível (MONTEIRO, 1988). O sistema mais comum de utilização de culturas em rotação envolve a retirada da cana em setembro-outubro, destruição da soqueira, calagem, preparo do solo visando a

cultura a ser instalada, plantio da cultura anual, sua colheita em fevereiro-março e plantio da cana logo em seguida.

2.5 Marcadores moleculares no melhoramento de plantas

A agricultura tem papel essencial no fornecimento de matéria-prima para a alimentação humana e animal e o sucesso dessa atividade nos últimos anos está relacionado ao melhoramento genético de plantas de interesse econômico (OLIVEIRA et al., 2007). A utilização de técnicas clássicas de melhoramento juntamente com tecnologias avançadas, considerando vantagens e limitações de cada uma delas, aumenta a eficiência de seleção e maximização de ganhos genéticos durante o melhoramento e são responsáveis pelo incremento de produtividade das culturas (SALGADO; PINHO, 2006).

Dentre as tecnologias empregadas atualmente, estão os marcadores moleculares, que permitem a seleção de indivíduos superiores baseando-se no genótipo. Os marcadores moleculares podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo molecular originado a partir de um gene expresso (isoenzimas) ou de um fragmento de DNA que pode ou não corresponder a regiões expressas do genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Inicialmente, os estudos genéticos e de melhoramento utilizavam marcadores controlados por genes relacionados a caracteres morfológicos e de fácil visualização no organismo (OLIVEIRA et al., 2007). Os marcadores morfológicos contribuíram para o desenvolvimento dos princípios teóricos nesse campo, no entanto, o número reduzido de marcadores morfológicos diferentes em uma mesma linhagem diminuía a possibilidade de associação com caracteres de importância econômica (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Além disso, a disponibilidade desses marcadores era restrita a poucas espécies; estes podem sofrer influência do ambiente e mutações deletérias limitaram sua utilização (SALGADO; PINHO, 2006).

Inúmeros foram os avanços quanto aos marcadores moleculares, o desenvolvimento dos diversos tipos de marcadores e a quantidade de marcadores

foi ampliada, tornando possível a aplicação dessa técnica em diversas espécies vegetais.

Os marcadores moleculares baseados em DNA constituem uma ferramenta rápida e eficaz para estudos genômicos, uma vez que identificam polimorfismos diretamente ao nível do DNA. Com base nesse polimorfismo, é possível inferir sobre as relações entre o genótipo e o fenótipo dos indivíduos (MARTINS et al., 2011). A existência de diversas técnicas moleculares e suas diferenças de princípios e metodologias requer análise cuidadosa na escolha de um ou mais tipos de marcadores, uma vez que uns são mais apropriados que outros dependendo da informação que se deseja obter (SEMAGN et al., 2006; MELO et al., 2011).

As vantagens dos marcadores moleculares podem ser inúmeras: são ilimitados e estão por todo o genoma; independem de influências ambientais, condições fisiológicas ou do estágio de desenvolvimento da planta; não são tecido-específicos e apenas uma pequena amostra é necessária para análise genética (SALGADO; PINHO, 2006; SHAW et al., 2009; MELO et al., 2011)

Um marcador molecular ideal deve possuir algumas características: ser altamente polimórfico, ter herança codominante possibilitando a diferenciação entre homozigotos e heterozigotos, ter distribuição uniforme e frequente pelo genoma, tornando a análise fácil, rápida e de baixo custo; ter alta reprodutibilidade permitindo o intercâmbio de dados entre laboratórios (KUMAR et al., 2009)

2.6 Marcador molecular microssatélite (SSR)

Marcadores moleculares do tipo microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*), consistem em 1 a 5 nucleotídeos repetidos em sequência. As regiões de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo seleção de *primers* específicos que amplificam, via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Quando os microssatélites são individualmente amplificados, usando o par de *primers* complementares às sequências únicas que os flanqueiam quase que

invariavelmente mostram extensivo polimorfismo para tamanho de bandas. A variação do tamanho dos produtos de PCR é uma consequência advinda de diferentes números de unidades repetitivas dentro da estrutura do SSR (CREGAN et al., 1999). Dessa forma, cada microssatélite, independentemente do elemento repetitivo, constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo. Essa natureza altamente informativa, combinada com a especificidade e rapidez da tecnologia PCR, fazem desses marcadores uma eficiente ferramenta para estudos de genes eucarióticos (AKKAYA et al., 1992).

O polimorfismo dos microssatélites é consequência dos diferentes números de unidades repetitivas presentes no genoma e o resultado pode ser visualizado em gel de poliacrilamida ou agarose especial de alta resolução, sendo que é necessário um gel adequado para a separação de segmentos que diferem por poucos pares de bases (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). São marcadores co-dominantes, facilmente reproduzíveis, hipervariáveis e têm as vantagens de ser de rápida detecção e de permitir a análise de grande número de combinações de *primers* por amostras em géis multiplex. A grande limitação da técnica de microssatélites é o desenvolvimento dos *primers*, que dependem do conhecimento das sequências que flanqueiam as bases repetidas (MCCOUCH et al., 1997). Assim, necessita-se de muito trabalho para o desenvolvimento prévio desses marcadores. Entretanto, esta etapa pode ser eliminada em função do aumento da disponibilidade de *primers* de microssatélites para várias espécies (LANZA et al., 2000).

2.7 Seleção assistida por marcadores moleculares

O melhoramento convencional aliou-se às técnicas de biologia molecular para selecionar genótipos superiores com o auxílio dos marcadores moleculares (FRONZA, 2003). Atualmente, vários programas de melhoramento têm utilizado as técnicas moleculares visando a seleção assistida por marcadores moleculares - SAMM (ALZATE-MARIN et al., 2005; BENCHIMOL et al., 2005).

Um dos primeiros trabalhos sobre seleção assistida por marcadores foi feito por Stuber et al. (1982), com a utilização de oito locos isoenzimáticos em uma

população melhorada de milho. Verificou-se que a seleção baseada nesses locos possibilitou o aumento tanto da produtividade de grãos como no número de espigas. No entanto, não houve como saber se as alterações nessas características foram devido a ligações com poligenes ou à participação dessas aloenzimas em suas rotas metabólicas.

A SAMM tem sido bastante utilizada em várias culturas, sendo que Federizzi (1998) enfatiza que esta é possivelmente a área que possui maior impacto dentro dos programas de melhoramento, pela sua utilização na identificação de genótipos superiores em populações segregantes. Os alelos desfavoráveis podem ser eliminados ou bastante reduzidos durante os estádios iniciais de desenvolvimento das plantas, conduzindo-se a seleção no campo, de um reduzido número de plantas.

As vantagens da SAMM foram analisadas por LEE (1995), onde o mesmo considerou que devem ser avaliados o custo e o tempo para o desenvolvimento de cultivares e para a seleção dos caracteres de interesse. O autor ressaltou que o uso dos marcadores moleculares será vantajoso quando o loco de resistência e o marcador estiverem fortemente ligados e ainda quando forem usadas as primeiras gerações de segregação para evitar a erosão da ligação entre o loco e a marca.

Uma das etapas mais importantes no uso de marcadores moleculares é o estabelecimento da relação entre um dado marcador e um loco de interesse, sendo uma etapa trabalhosa e que exige bastante critério. Devido ao fenômeno de recombinação, as regiões que circunvizinham o loco de interesse podem ser distintas, mesmo entre genótipos aparentados. Portanto, um marcador polimórfico entre progenitores A e B, pode não ser polimórfico entre A e C. Logo, para cada cruzamento, marcadores específicos devem ser identificados. Em muitos casos, no entanto, um mesmo marcador pode ser útil em diferentes populações derivadas de diferentes cruzamentos (ALZATE-MARIN et al., 2005).

O sucesso da SAMM depende do grau de associação entre o marcador e a característica de interesse: quanto maior, menor a chance de ocorrer recombinação entre o marcador e o gene que controla a característica, sendo maior a eficiência da seleção.

Diversos estudos têm sido realizados para obtenção de um mapa de ligação saturado para a soja e para a identificação e validação de QTL's associados a

características de interesse agrônômico em soja, tais como produção de grãos e conteúdo de proteína e óleo na semente. Com a identificação de marcadores moleculares associados à QTL's que aumentem o teor de óleo, abrem-se perspectivas de uma melhor orientação dos cruzamentos a serem realizados, através da combinação dos efeitos de diferentes QTL's, o que possibilita a seleção de genótipos que expressem ao máximo o potencial para produção de óleo.

2.8 Mapeamento de QTLs para teor de óleo

A grande maioria dos caracteres de importância econômica em plantas é classificada como de natureza quantitativa. Tais caracteres são aqueles cuja expressão fenotípica apresenta uma variação contínua, atribuída à segregação simultânea de muitos genes distribuídos pelo genoma. As regiões cromossômicas referentes à sua localização são definidas como QTLs ("Quantitative Trait Loci"). Com o advento dos marcadores moleculares tornou-se possível mapear tais regiões (QTL's) que afetam esses caracteres quantitativos. Sendo assim, mapear um QTL significa identificar sua posição no genoma e estimar seus efeitos genéticos, tais como: o efeito aditivo, efeito de dominância e outros efeitos presentes no modelo adotado (TOLEDO et al, 2008).

Alguns trabalhos já encontram-se descritos visando identificação de QTL's para os teores de óleo em soja utilizando diferentes marcadores, tipos e tamanhos de populações, além de citarem a utilização de genótipos adaptados e exóticos.

Panthee et al. (2005) detectaram QTL's para teor de óleo e proteína em uma população de 101 RIL's obtidas do cruzamento entre N98-984 e TN93-99. Entre 585 SSRs testados, 94 marcadores foram polimórficos, sendo avaliados na população. Um QTL no GL G explicou cerca de 20% do teor de proteína e três QTL's nos GL D1b, G e O explicaram 11,8; 9,4 e 15% do teor de óleo nesta população.

Nichols et al. (2006) avaliaram diferentes populações de isolinhas $RC_4F_{3:4}$ e RC_5F_5 para teor de óleo e proteína e marcadores SSRs e AFLPs do GL I. Utilizando as populações $RC_4F_{3:4}$, mapearam um QTL para teor de proteína e óleo no intervalo de 11 cM entre as marcas Satt614 e Satt354. Na análise com as populações RC_5F_5 , a localização deste QTL foi redefinida no intervalo de três cM entre os marcadores

Satt239 e ACG9b e o QTL explicou 15,4, 11,7, 17,7 e 21,1% da variação do teor de proteína em cada população RC₅F₅ avaliada.

Um estudo genético da concentração de ácidos graxos e do conteúdo de lipídios em *G. max* x *G. soja* apresentou distribuição normal e alta herdabilidade em F₂ e populações recombinantes testadas, além disso, verificou-se uma correlação negativa entre tais caracteres. Um QTL para o conteúdo lipídico e concentração de ácido linoleico foi detectado na mesma posição próximo a um marcador SSR Satt384 nos grupos L G E, sugerindo que os fatores que controlam o conteúdo de lipídios podem ser parcialmente compartilhados com os responsáveis pela concentração de ácido linoleico (SHIBATA et al., 2008).

Conforme observa-se, existem muitos estudos descritos na literatura, os quais detectaram e caracterizaram QTL's em populações de genótipos de soja para os conteúdos de óleo no grão. Muitos destes locos, entretanto, não foram validados em diferentes ambientes ou *backgrounds* genéticos. Por isso, estudos complementares são necessários, com a finalidade de validar e confirmar a consistência de tais QTL's já relatados para que estes locos possam ser explorados em estratégias de processos de Seleção Assistida por Marcadores dentro de programas de melhoramento genético convencionais, possibilitando dessa forma maiores ganhos genéticos no processo seletivo deste importante componente do grão da soja.

2.9 Espectroscopia por infravermelho próximo (NIR)

O termo espectroscopia refere-se à interação de qualquer tipo de radiação eletromagnética com a matéria. O Infravermelho próximo corresponde a região posterior à do visível, compreendendo os comprimentos de onda de 750 a 2500 nm, com números de onda de 13300 a 4000 cm⁻¹, respectivamente (PASQUINI, 2003).

O uso da espectroscopia NIR (*Near InfraRed spectroscopy*) tem como objetivo principal obter informações qualitativas ou quantitativas de uma amostra, por meio da interação das ondas eletromagnéticas do infravermelho com os constituintes da amostra. As ocorrências espectrais na região do infravermelho próximo provêm de ligações em que o hidrogênio participa, o que torna a técnica útil para a

determinação de compostos orgânicos contendo principalmente ligações C-H, O-H, N-H e S-H, sem que haja necessidade de pré-tratamento da amostra (PASQUINI, 2003).

Quando comparada a outros métodos químicos, a espectroscopia NIR possui vantagens, pois, em geral, não necessita de preparação de amostras, não gera resíduo, é rápida e não destrutiva (GONZAGA, 2006).

A relação entre o resultado da resposta instrumental com a propriedade de interesse da amostra é denominada calibração. A equação matemática que descreve a relação é o modelo de calibração e a representação gráfica é chamada de curva analítica ou curva de calibração (PIMENTEL; NETO, 1996). O processo de calibração consiste geralmente em duas etapas: a descritiva, que usa concentrações conhecidas para construir um modelo que relaciona a grandeza medida com a concentração da espécie de interesse, e a preditiva, a qual utiliza este modelo para pressupor concentrações de novas amostras, a partir dos sinais analíticos mensurados por estas (PIMENTEL; NETO, 1996).

Para construir uma curva de calibração confiável, necessária para as leituras por NIR, é preciso um método de referência com boa reprodutibilidade e que forneça resultados que apresentem boa correlação com os espectros gerados pelo NIR. Também é desejável que a curva tenha uma amplitude considerável, isto é, que seja aplicável para um grande número de amostras, as quais podem ter os mais variados valores, sendo estes abrangidos pela curva. Na construção de uma curva de calibração, também se busca o menor desvio possível, ou seja, maior precisão dos resultados (CORRÊA, 2014).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, Pittsburgh, v.133, p.1131-1139, 1992.

ALONSO, D.L.; MAROTO, F. G. Plant as “chemical factories” for the production of polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, New York, v.19, p.481-497, 2000.

ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 333-342, 2005.

BENCHIMOL, L.L.; LANZA, L.L.B.; SOUZA, J.R.; SOUZA, A. P. Microsatellite-assisted backcross selection in maize. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 4, p. 789-797, 2005.

BIODIESEL. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com>>. Acesso em: 9 ago. 2010.

CÂMARA, G. M. S. Potencial da cultura da soja como fonte de matéria-prima para o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel. In: CÂMARA, G. M. S.; HEIFFIG, L. S. (Coord.). **Agronegócio de plantas oleaginosas: matérias-primas para Biodiesel**. Piracicaba: ESALQ, 2006. p.123 – 153.

CARUSO, R. **Soja: uma caminhada sem fim**. Campinas: Fundação Cargill, 1996. 95p.

CONAB — Companhia Nacional de Abastecimento. 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 22 oct. 2014.

CORRÊA, A. A. P. **Abordagem multivariada, perfil composicional e construção de curva de calibração para predição do teor de óleo em *Jatropha curcas* L.** 2014. 57f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

CREGAN, P.B.; MUDGE, J.; FICKU S, E.W. Targeted isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.98, p.919-928, 1999.

DUNTON, H. J.; LANCASTER, C. R.; EVANS, C. D.; COWAN, J. C. The flavor problem of soybean oil VII.Linolenic acid. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 28, p. 115-118, 1951.

ECONOMIC implications of modified soybean traits. Ames: Iowa Soybean Promotion Board, American Soybean Association, 1990. 88p. (Special Report, 92).

EMBRAPA. **Composição química média da soja em grão**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br>>. Acesso em: 10 ago. 2010.

FEDERIZZI, L.C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.3-15.

FEHR, W.R.; Breeding for Modified Fatty Acid Composition in Soybean. In: MATTA, L.B. **Melhoramento genético da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) para baixo teor**

de ácido linolênico. 2008. 58f. Dissertação (Mestrado Programa de Fitotecnia)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

FRONZA, V. **Genética da reação da soja a *Fusarium solanif.sp.glycines*.** 2003. 166f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V.S.; SCABIO, A. Biodiesel from soybean: characterization and consumption in an energy generator. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n.1, 2005.

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

GONZAGA, F. B. **Desenvolvimento de um Espectrômetro de Emissão para a Região no Infravermelho Próximo.** 2006. 117f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

KLEIMAN, R.; CAVINS, J.F. Soybean germoplasm evaluation search for low-linolenic lines. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago,v.59, p.305, 1982.

KUMAR, P.; GUPTA, V.K.; MISRA, A.K.; MODI, D.R.; PANDEY, B.K. Potential of molecular markers in plant biotechnology. **Plant Omics Journal**,v.2, n.4, p.141-162, 2009.

LAGO, R. C. A.; CASTRO, A. T. B. de ; MAGALHÃES, M. P. de. Composição de óleos de soja: I. Variedades procedentes de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 2, p. 1-5, 1978.

LANZA, M.B.; GUIMARÃES, C.T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.21, n.204, p.97-108, 2000.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs.**Advances in Agronomy**, San Diego, v.55, p.265-343, 1995.

LIU, H., WHITE, P. J. Oxidative stability of soybean oils with altered fatty acid composition. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v.69, n .6, p.528-532, 1992.

McCOUCH, S.R.; CHEN, X.; PANAUD, O.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y.G.; HUANG, N.; ISHII, T.; BLAIR, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht , v. 35, p.89-99, 1997

MANARA, N.T.F. Origem e expansão. IN: SANTOS, O.S. (Coord.). A. cultura da soja 1 – Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. **Globo**, São Paulo, p. 13-23, 1988.

MAPA.- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano nacional de agroenergia**. Disponível em:< www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 9 ago. 2010.

MARTINS, A.B.G.; RODRIGUES, M.G.F.; PAULA, D.R.; MENDES, H.S.J.; ARANTES, F.C.; SILVA, C.L.S.P. Caracterização molecular e diversidade genética de diferentes variedades de abacate por marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.4, p.1178-1184, 2011.

MAURO, A.O.; COSTA, L.C.; PERECIN, D. Análises genéticas no desenvolvimento de variedades de soja para cultivo em áreas de reforma de canavial. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v.46, n.266, p.423-433, 1999.

MELO, R.A.; RESENDE, L.V.; MENEZES, D.; BECK, A.P.A.; COSTA, J.C.; COUTINHO, A.E.; NASCIMENTO, A.V.S. Genetic similarity between coriander genotypes using ISSR markers. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.29, n.4, p.526-530, 2011.

MISSÃO, M. R. SOJA: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. **Maringá Management: Revista de Ciências Empresariais**, Maringá, v. 3, n.1 - p.7-15, 2006.

MONTEIRO, A.O.; FERREIRA, E.S. Projeto rotação de culturas - principais resultados obtidos. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA, 3., 1986, Piracicaba. **Anais...** São Paulo: Copersucar, 1986. p.87-200

MONTEIRO, A.O. Rotação de culturas na lavoura canavieira. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA, 4., 1988, Piracicaba. **Anais...** São Paulo: Copersucar, 1988. p.67-95

MONTEIRO, R.S.; SANTOS, R.T.P.; MONTEIRO JÚNIOR, N.; ARANDA, D.A.G. Biodiesel metílico e etílico de palma sobre ácido nióbico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO E GÁS, 3., 2005, Salvador. **Anais...**

NICHOLS, D.M.; GLOVER, K.D.; CARLSON, S.R.; SPECHT, J.E.; DIERS B.W. Fine mapping of a seed protein QTL on soybean linkage group I and its correlated effects on agronomic traits. **Crop Science**, Madison, v.46, p.834-839, 2006.

OLIVEIRA, A.C.B.; CAIXETA, E.T.; ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N.S. **Aplicação técnica de marcadores moleculares no melhoramento de plantas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007. 17p. (Documentos IAC, 81)

PANTHEE, D.R.; PANTALONE, V.R.; WEST, D.R.; SAXTON, A.M.; SAMS, C.E. Quantitative trait loci for seed protein and oil concentration and seed size in soybean. **Crop Science**, Madison, v.45, p.2015-2022, 2005.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. Campinas-SP: **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 14, p.198-219, 2003.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 268-277, 1996.

PINTO, A.C.; GUARIEIRO, L.L.N; REZENDE, M.J.C; RIBEIRO, N.M; TORRES, E.A.; LOPES, W.A; PEREIRA, P.A.P; ANDRADE, J.B. Biodiesel: An Overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6, 2005.

SALGADO, K.C.P.; PINHO, E.V.R.V. **Uso de técnicas moleculares em estudos fisiológicos e genéticos em sementes**. Lavras: UFLA, 2006. 111p.

SEDIYAMA, T.; PEREIRA, M.G.; SEDIYAMA, C.S.; GOMES, J.L.L. **Cultura da Soja**. Viçosa: Editora UFV, 1993. 97p.

SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, Å.; NDJIONDJOP, M.N. An overview of molecular marker methods for plants. **African Journal of Biotechnology**, South Africa, v.5, n.25, p.2540-2568, 2006.

SHIBATA, M.; TAKAYAMA, K.; UJIIE, A.; YAMADA, T.; ABE, J.; KITAMURA, K. Genetic relationship between lipid content and linolenic acid concentration in soybean seeds. **Breeding Science**, Tokyo, v.58, p.361-366, 2008.

SHAW, P.C.; WONG, K.L.; CHAN, A.W.K.; WONG, W.C.; BUT, P.P.H. Patent applications for using DNA technologies to authenticate medicinal herbal material. **Chinese Medicine**, Garden City, v. 4, p.10-21, 2009.

STUBER, C.W.; GOODMAN, M.M.; MOLL, R.H. Improvement of yield and ear number resulting from selection at allozyme loci in a maize population. **Crop Science**, Madison, v.22, n.4, p.737-740, 1982.

TEIXEIRA, L.C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 18-27. 2006.

TOLEDO, E. R.; LEANDRO, R. A.; SOUZA JUNIOR, C. L.; SOUZA, A. P. Mapeamento de QTLs: uma abordagem Bayesiana. **Revista Brasileira Biom.**, São Paulo, v.26, n.2, p.107-114, 2008.

YADAV, N. S. Genetic modification of soybean oil quality. In: VERMA, D. P. S, SHOEMAKER, R. C (Ed.). **Soybean: genetics, molecular biology and biotechnology**. USA: CAB International, 1996.

CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO DE CURVA DE CALIBRAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÓLEO EM SOJA

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma curva de calibração utilizando a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) para estimar o teor de umidade e óleo em sementes de soja, sem a necessidade de destruição das mesmas. Os espectros foram obtidos na faixa de 12.000 a 4.000 cm^{-1} , com 64 scans e 16 cm^{-1} de resolução, sendo as análises realizadas em cinco repetições. Após a obtenção dos espectros foi determinado o teor de umidade e a extração do teor de óleo, os quais foram realizados em duplicata para cada genótipo. Os espectros foram reprocessados por várias combinações de pré-tratamentos matemáticos para que fosse obtido o melhor modelo PLS (Partial Least Squares). Os coeficientes de correlação e os erros quadráticos médios dos modelos de calibração (RMSEC) foram, respectivamente, de 76% e 0,33 para umidade e 57% e 1,27 para óleo, enquanto que para os modelos de validação o RMSECV foi de 0,38 e $R^{2\text{CV}}$ de 68% para umidade e RMSECV de 1,33 e $R^{2\text{CV}}$ de 53% para óleo. Tais resultados indicam a viabilidade da metodologia NIR para predição dos parâmetros de umidade e teor de óleo em sementes de soja, principalmente por ser uma técnica não destrutiva, visando a utilização para o processo seletivo em programas de melhoramento, na seleção de progênies superiores em populações segregantes de soja.

Palavras-chave: melhoramento genético, *Glycine max*, NIR

1 INTRODUÇÃO

Com relação à realidade atual da produção do Biodiesel, sabe-se que as usinas processadoras de cana-de-açúcar estão com grande interesse no setor, por existir a possibilidade de instalação de pequenas usinas de processamento de Biodiesel, junto a estas Usinas de Açúcar e álcool, visando abastecimento de sua frota permanente. Sendo assim, a soja produzida em áreas de reforma de cana-de-açúcar pode ser destinada a tais unidades, para processamento e obtenção do Biodiesel, devendo para tanto atender às premissas de bons conteúdos de teor de óleo, além de precocidade e produtividade, de modo a atender ao cronograma de plantio da cultura da cana-de-açúcar, no sistema de rotação.

A existência de poucos cultivares modernos de soja recomendados para plantio em áreas de reforma de canavial na atualidade, e o crescente aumento de áreas ocupadas com a cultura da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, são fatores de grande importância e que reforçam a necessidade de obtenção de novos cultivares em substituição aos cultivares obsoletos existentes e que atendam este sistema agrícola que encontra-se em rápida expansão.

Acompanhando este processo, o Biodiesel vem sendo estudado como uma alternativa aos combustíveis derivados do petróleo, pois é um combustível biodegradável e derivado de fontes renováveis, podendo ser produzido, por exemplo, a partir de óleos vegetais, tais como soja, mamona, dendê (palma), girassol, babaçu, amendoim e pinhão manso.

Sendo assim, é de extrema importância que o caráter teor de óleo seja consolidado nos programas de melhoramento genético da cultura objetivando a obtenção desses novos cultivares de forma a atender a demanda do mercado atual. Para isso faz-se necessário o conhecimento da qualidade do grão de soja bem como o fracionamento da composição química do óleo presente no grão para fins de produção de Biodiesel.

Além do teor de óleo, também merece destaque o teor de umidade contido na semente de soja. O segundo se destaca por estar relacionado intrinsecamente à qualidade da semente após o processo de colheita e também no armazenamento da mesma. O primeiro, por sua vez, constitui-se um dos caracteres de maior

importância da cultura da soja, por se tratar de um dos principais produtos comerciais derivados do grão.

Diante disso, em um programa de melhoramento genético de soja, todas as características devem ser preferencialmente avaliadas de forma não destrutiva pela ausência de repetição de indivíduos segregantes, onde os indivíduos selecionados devem permanecer para comporem as gerações futuras. Para o caso de genótipos já fixados, uma técnica não destrutiva também faz-se necessário pelo fato de não haver gasto de sementes genéticas para as aferições por métodos destrutivos, reduzindo o custo do processo.

Dentro desse contexto, a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR), é uma técnica adequada para a avaliação de caracteres desta natureza permitindo a seleção de genótipos superiores, sem destruição das sementes e fornecendo resultados seguros, precisos e de forma rápida.

O modelo ou curva de calibração por espectroscopia no infravermelho é uma técnica rápida e capaz de analisar substâncias orgânicas de forma confiável. A adoção desse método analítico apresentou um importante impacto na indústria de alimentos e agricultura (FERREIRA et al. 2013).

Mediante ao exposto, o objetivo do presente trabalho consiste no desenvolvimento de um modelo de calibração para os caracteres de teor de umidade e percentual de óleo em sementes íntegras de soja, a partir da espectroscopia no infravermelho próximo (NIR), visando aplicação dos referidos modelos em programas de melhoramento de soja, em processos seletivos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram utilizados 262 genótipos de soja colhidos no ano agrícola 2012/13 pertencentes ao programa de melhoramento de soja da UNESP – FCAV, os quais consistem em linhagens avançadas com elevado grau de endogamia, sendo os mesmos totalmente estáveis quanto ao desempenho fenotípico e homozigóticos

quanto à constituição genotípica descritos na Tabela 1. Foram tomadas amostras de 80 g (gramas) de cada genótipo para a obtenção dos espectros das sementes íntegras, no equipamento NIR da marca Bruker Modelo TANGO.

TABELA 1: Genótipos de soja e respectivas genealogias, utilizados para obtenção dos valores de referência para o teor de umidade e o percentual de óleo.

Genealogia	Genótipos
FT-Cometa x Bossier	L11, L2, L8, L13, Jalles L47, L3, L6, L14, L21, L19, L18, L17
FT-Cometa x Paraná	L70, Jalles L50, L23, Jalles L51, L69, L62, L60, L63, L61, L57, L59, L71, L66, L64, L67, L68
BR-16 x Ocepar 4	Jalles L49, L54, L53, L52, Jalles L48
IAC-Foscarin 31	L75
FT-Cometa x IAC 8	L43, L40, L37, L36, L34, L38, L30, L27
Monsoy 7501	L47
Coodetec 205	L74
Tracy-M x Paraná	L73
IAC23	L26, L24, L25
(Br-16 x Tainung-3)x(CAC-1 x BRS-137)x(Embrapa-59 x FT-2)x(Conquista x Coodetec-204)	L72
Embrapa 48 x Conquista	JAB42, JAB43
Coodetec 204 x Liderança	JAB2, JAB5, JAB6, JAB4, JAB3
Conquista x IAC-Foscarin 31	JAB25, JAB30, JAB21, JAB27, JAB29, JAB26
Conquista x Coodetec 204	JAB1
Embrapa 48 x IAC 20	JAB28, JAB24, JAB22, JAB23
IAC 17 x BR-16	JAB17
CAC 1 x BR-19	JAB11
(Hartwig x BRS-134)x(Tainung-4xRenascença)	JAB10, JAB7
(Tainung-4 x Renascença)x(FT-Estrela x BRS-134)x(Embrapa-59 x Coodetec-204)x(CAC-1 x BRS-137)	JAB37, JAB33, JAB34, JAB35, JAB36
IAC 17 x BR-17	JAB46, JAB45, JAB39, JAB44, JAB40
(BRS-137 x Hartwig)x(IAC-8-2 x Embrapa48)	JAB12
CAC 1 x BR-18	JAB41, JAB31
(Hartwig x BRS-134)x(Coodetec-201 x BRS MS Bacuri)	JAB9
Embrapa 48 x IAC 22	JAB32, JAB38
Embrapa 48 x IAC 21	JAB19
Embrapa 48 x IAC 23	JAB18
Embrapa 48 x IAC 18	JAB20
Embrapa 48 x IAC 17	JAB15
CAC 1 x BR-17	JAB14
Embrapa 48 x IAC 19	JAB8
IAC 17 x BR-18	JAB16
	JAB13

Pi 200526 Shiranui x Coodetec 205	BV13, BV28, BV14, BV15, BV30, BV24, BV26 BV29, BV9, BV17, BV16, BV1, BV23, BV22, BV11, BV4, BV3, BV2, BV8, BV5, BV32, BV21, BV25, BV12, BV10, BV6, BV20, BV7, BV18, BV27, BVV17, BVV41, BVV48, BVV23, BVV9, BVV34, BVV6, BVV7, BVV45, BVV27, BVV44, BVV40, BVV28, BVV56, BVV10, BVV31, BVV3, BVV54, BVV8, BVV14, BVV16, BVV32, BVV4, BVV36, BVV1, BVV47, BVV2, BVV33, BVV20, BVV51, BVV13, BVV46, BVV37, BVV12, BVV15, BVV35, BVV22, BVV21, BVV5, BVV30 BV33, BVV38 BV31, BVV42 BV5, BVV49
Pi 200456 x MGBR46 Conquista	
Conquista	
Coodetec 219	
Coodetec 216	
Pi 200456 x FT Cometa	BVV25, BVV52, BVV55, BVV29, BVV24 BVV60 BVV18 BVV58 BVV59
Coodetec 207	
Confiança x Sambaíba	EB37, EB80, EB62, EB78, EB69, EB27, EB63, EB64, EB28, EB46, EB25, EB61, EB33, EB71, EB55, EB35, EB59, EB67, EB43, EB66, EB58, EB49, EB51, EB72, EB39, EB76, EB75, EB70, EB34, EB60, EB45, EB38, EB32, EB57, EB44, EB68, EB30, EB83, EB65, EB41, EB31, EB81, EB82, EB40, EB47, EB74, EB53, EB77, EB36, EB29, EB42, EB79, EB48, EB52 EB6, EB20, EB10, EB13, EB16, EB11, EB5, EB17, EB24, EB21, EB22, EB12, EB19, EB18, EB23, EB9, EB14, EB8, EB15 EB4 EB86, EB85, EB87 EB90, EB88 EB3, EB1, EB2
Sambaíba x IAC 17	
Renascença x Matrinxã	
Conquista x Kinoshita	
BRS 231 x Matrinxã	
Conquista x Matrinxã	

2.2 Obtenção dos espectros NIR

As amostras foram analisadas pela reflectância difusa utilizando acessório de rotação. Os espectros foram obtidos na faixa de 12.000 a 4.000 cm^{-1} , com 64 scans e 16 cm^{-1} de resolução. Foram colhidos 5 espectros no equipamento Tango-NIR para cada amostra de semente.

2.3 Determinação dos teores de umidade e óleo por métodos de referência

Para a determinação dos teores de umidade e óleo, ambos os testes foram

efetuados no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas pertencente ao Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (UNESP – FCAV).

Após a obtenção dos espectros, as amostras de sementes foram pesadas e dispostas em estufa a 105°C durante 24 horas para determinação da umidade e massa seca das amostras (BRASIL, 2009).

Após a secagem, as amostras das sementes foram trituradas em moinho do tipo FACA da marca Metalúrgica Roma, modelo MR 340 e peneira de 1mm. Com parte do material moído, foi extraído e quantificado o óleo, sendo cada genótipo analisado em duplicata.

A extração do óleo das sementes foi realizada por meio do equipamento modelo TE 044-5/50 (Fabricante Tecnal). O método de extração foi por processo contínuo do tipo “Soxhlet” conforme descrito no AOAC (1999), sendo utilizado éter de petróleo como solvente, cujo ponto de ebulição é 60°C.

2.4 Pré-tratamento dos espectros

Os espectros NIR, em geral, apresentam problemas na linha de base devido ao “espalhamento” da luz em função da não homogeneidade da distribuição das partículas de matriz (BJORSVIK; MARTENS, 2007). A fim de minimizar este fator, os espectros foram pré-processados por uma combinação de várias técnicas: MSC (Multiplicative Scatter Correlation - Geladi, MacDougall, e Martens, 1985), SNV (Standard Normal Variate Transformation - Barnes , Dhanoa, e Lister, 1989) ou a primeira (1SG) e segunda derivada (2SG), utilizando o método Savitzky-Golay (Broun, Vega-Montoto, & Wentzell, 2000) sendo que todos os dados espectrais foram centrados na média.

2.5 Desenvolvimento dos modelos de calibração e validação

Foi utilizado o Software OPUS 7.0 para a construção dos modelos de calibração e validação. Do total das 262 amostras de genótipos de soja utilizadas

para a construção dos modelos, 254 foram utilizadas para a construção dos modelos de calibração e validação para o teor de óleo, enquanto 241 amostras foram utilizadas para a construção dos modelos de calibração e validação para o teor de umidade. Os demais genótipos não utilizados para a construção de ambos os modelos são considerados como outliers e foram identificados e removidos pelo próprio programa. Para a construção dos modelos foi utilizado a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS – Partial Least Squares), sendo que, os desempenhos dos modelos PLS foram avaliados de acordo com o erro quadrado médio de calibração (RMSEC), erro quadrado médio de validação cruzada (RMSECV) e coeficiente de determinação (R^2). Resultados elevados de R^2 e valores baixos de RMSE indicam o melhor modelo para predição do atributo a ser analisado.

O parâmetro do erro empregado foi a raiz quadrada do erro quadrático médio de calibração RMSEC e de validação RMSECV. Os valores de RMSE foram obtidos pela Equação (1):

$$RMSE = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2 / n}$$

Onde: (1)

n = número de amostras (conjunto de calibração ou o conjunto de predição)

y_i = valor médio pelo NIR

x_i = valor médio pela metodologia padrão

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise de composição do grão de soja

Os resultados obtidos pelas análises de referência com relação aos teores de umidade e percentual de óleo podem ser observados na Tabela 2. A variabilidade dos resultados, representada pelo desvio padrão, é colocada nos erros de previsão e os resultados são então validados (Tabela 3).

TABELA 2: Valores de referência dos genótipos de soja utilizados para a construção dos modelos de calibração e validação do teor de umidade e percentual de óleo.

Genótipos	Teor de umidade (%)	Matéria Seca (g)	EE	EE-MS	Média EE
L11	8,37792127	91,62207873	19,5894 18,8415	21,3807 20,5644	20,9725
L70	8,029469043	91,97053096	16,6556 17,9323	18,1098 19,4979	18,8038
L4	8,329000014	91,67099999	20,6016 20,7578	22,4734 22,6438	22,5586
L2	8,191191521	91,80880848	16,8778 17,0101	18,3836 18,5277	18,4557
Jalles L50 (L69)	8,215154328	91,78484567	21,2535 20,2535	23,1558 22,0663	22,6110
Jalles L49 (L54)	8,288780396	91,7112196	21,1802 21,8018	23,0944 23,7722	23,4333
L8	8,232475144	91,76752486	21,8264 21,9435	23,7845 23,9120	23,8483
L54	8,164231225	91,83576877	20,7688 20,0204	22,6152 21,8003	22,2077
L53	8,003836322	91,99616368	19,0923 19,4665	20,7534 21,1602	20,9568
L52	8,046541346	91,95345865	16,5893 17,2099	18,0409 18,7159	18,3784
Jalles L48 (L53)	8,210760628	91,78923937	21,1538 21,1033	23,0461 22,9910	23,0186
L13	8,37522916	91,62477084	16,6568 17,7874	18,1794 19,4134	18,7964
Jalles L51 (L70)	8,011799491	91,98820051	20,7720 19,2844	22,5812 20,9640	21,7726
Jalles L47 (L2)	8,222964949	91,77703505	19,3636 19,6716	21,0986 21,4341	21,2663
L23	8,317562674	91,68243733	19,7193 20,0974	21,5082 21,9206	21,7144
L3	8,135819897	91,8641801	18,3171 19,7471	19,9394 21,4960	20,7177
L71	8,879787598	91,1202124	20,8950 20,3655	22,9312 22,3502	22,6407
L6	8,21300916	91,78699084	18,2933 18,9694	19,9302 20,6668	20,2985
L69	8,127884195	91,87211581	16,7765 16,6449	18,2607 18,1174	18,1891
L62	8,208668631	91,79133137	20,0690 19,8803	21,8637 21,6582	21,7609

L60	6,490212575	93,50978742	19,8854 20,0485	21,2656 21,4400	21,3528
L63	6,605172106	93,39482789	18,4894 19,1644	19,7971 20,5197	20,1584
L61	6,495476614	93,50452339	20,0093 18,8750	21,3993 20,1861	20,7927
L57	6,476896949	93,52310305	20,3389 20,3455	21,7475 21,7545	21,7510
L59	6,426469544	93,57353046	20,9448 19,8490	22,3832 21,2122	21,7977
L14	6,48521152	93,51478848	18,8725 17,7627	20,1812 18,9945	19,5879
L75	6,766259629	93,23374037	17,7694 20,7226	19,0590 22,2265	20,6427
L43	6,939405984	93,06059402	18,4786 17,0529	19,8565 18,3246	19,0906
L47	6,410119568	93,58988043	18,8604 18,7430	20,1522 20,0267	20,0895
L40	6,523399219	93,47660078	20,1979 18,7506	21,6075 20,0592	20,8333
L66	6,521118497	93,4788815	22,7002 21,2995	24,2838 22,7854	23,5346
L74	6,617877151	93,38212285	18,5812 17,3695	19,8980 18,6005	19,2492
L73	6,596664418	93,40333558	20,6264 20,2353	22,0831 21,6644	21,8738
L26	6,745551614	93,25444839	18,2260 21,4994	19,5444 23,0545	21,2995
L64	6,435033787	93,56496621	19,7557 19,0154	21,1144 20,3232	20,7188
L37	6,70662792	93,29337208	17,4693 19,7468	18,7251 21,1664	19,9457
L36	6,638227615	93,36177238	18,1179 19,3649	19,4062 20,7418	20,0740
L34	6,739225514	93,26077449	17,4157 17,5788	18,6742 18,8490	18,7616
L67	6,269209148	93,73079085	19,7849 19,0153	21,1082 20,2871	20,6977
L68	6,711112585	93,28888741	19,4765 19,5628	20,8776 20,9702	20,9239
L38	6,654000565	93,34599944	19,3330 19,4564	20,7111 20,8433	20,7772
L30	6,441216692	93,55878331	20,5673 19,7759	21,9832 21,1374	21,5603

L27	6,724426548	93,27557345	18,5835 18,3340	19,9232 19,6558	19,7895
L24	6,597865468	93,40213453	19,9106 19,8026	21,3171 21,2015	21,2593
L72	6,670905725	93,32909428	17,4851 16,5316	18,7348 17,7133	18,2241
L21	6,641662352	93,35833765	21,1390 18,3804	22,6428 19,6880	21,1654
L19	6,365536407	93,63446359	17,0209 16,8383	18,1781 17,9830	18,0805
L18	6,334539948	93,66546005	19,0017 17,0504	20,2868 18,2035	19,2451
L17	6,627703983	93,37229602	17,7333 18,3490	18,9920 19,6514	19,3217
L25	6,315689564	93,68431044	20,6814 19,8365	22,0756 21,1738	21,6247
JAB42	7,702539459	92,29746054	17,6943 16,5059	19,1709 17,8833	18,5271
JAB2	7,113897054	92,88610295	19,8764 21,0028	21,3986 22,6113	22,0050
JAB25	7,633038584	92,36696142	15,9842 18,2955	17,3051 19,8074	18,5563
JAB1	7,428844019	92,57115598	19,9237 19,7350	21,5226 21,3187	21,4207
JAB28	7,536175117	92,46382488	14,5499 14,7012	15,7358 15,8994	15,8176
JAB5	7,371562466	92,62843753	17,9444 16,8405	19,3724 18,1807	18,7765
JAB17	7,251535228	92,74846477	20,4753 19,5355	22,0761 21,0629	21,5695
JAB11	7,449927072	92,55007293	24,7687 18,8539	26,7625 20,3716	23,5670
JAB10	7,391844572	92,60815543	18,8327 16,7445	20,3359 18,0810	19,2085
JAB37	7,70160337	92,29839663	16,4278 16,6507	17,7986 18,0401	17,9193
JAB6	7,367969364	92,63203064	20,4423 18,6271	22,0683 20,1087	21,0885
JAB33	7,469101458	92,53089854	19,9928 19,1029	21,6066 20,6449	21,1258
JAB34	7,512834986	92,48716501	18,3847 19,0459	19,8781 20,5930	20,2355
JAB24	7,699227299	92,3007727	16,7478 17,2087	18,1449 18,6441	18,3945

JAB46	7,482230227	92,51776977	16,7083 16,7885	18,0595 18,1462	18,1029
JAB45	7,648207465	92,35179253	15,5778 15,2150	16,8679 16,4751	16,6715
JAB35	7,74754999	92,25245001	18,1726 17,2506	19,6988 18,6994	19,1991
JAB4	7,229812411	92,77018759	20,4587 19,9781	22,0531 21,5351	21,7941
JAB12	7,828464311	92,17153569	18,7075 17,6752	20,2964 19,1764	19,7364
JAB30	7,660249391	92,33975061	18,2088 18,0557	19,7193 19,5536	19,6365
JAB21	7,662346331	92,33765367	16,7132 17,3256	18,1001 18,7633	18,4317
JAB39	7,559609219	92,44039078	18,1747 17,0547	19,6609 18,4495	19,0552
JAB26	7,677227814	92,32277219	19,2035 18,2500	20,8004 19,7677	20,2840
JAB7	7,49836866	92,50163134	18,2070 17,5318	19,6829 18,9529	19,3179
JAB44	7,402608828	92,59739117	20,2232 19,0164	21,8399 20,5366	21,1883
JAB27	7,513154964	92,48684504	19,1498 18,0721	20,7054 19,5402	20,1228
JAB41	7,298443813	92,70155619	17,4471 16,8917	18,8207 18,2216	18,5212
JAB29	7,461302529	92,53869747	18,2729 17,9071	19,7462 19,3509	19,5485
JAB9	7,577322023	92,42267798	19,3581 18,7555	20,9452 20,2932	20,6192
JAB32	7,531460845	92,46853916	18,6616 18,2003	20,1815 19,6827	19,9321
JAB19	7,682536584	92,31746342	18,7899 18,0182	20,3536 19,5177	19,9356
JAB22	7,525484557	92,47451544	18,6015 19,1026	20,1152 20,6572	20,3862
JAB18	7,675061025	92,32493898	17,7863 16,4773	19,2649 17,8470	18,5560
JAB3	7,447472117	92,55252788	19,8404 19,8434	21,4369 21,4401	21,4385
JAB20	7,498824484	92,50117552	19,5098 18,8501	21,0914 20,3783	20,7348
JAB15	7,756898895	92,24310111	16,6919 17,5892	18,0955 19,0683	18,5819

JAB43	7,551470169	92,44852983	18,1346 18,3640	19,6159 19,8640	19,7399
JAB31	7,703309786	92,29669021	17,2249 16,4516	18,6625 17,8246	18,2436
JAB38	7,584295364	92,41570464	19,5490 19,9192	21,1533 21,5539	21,3536
JAB14	13,01061661	86,98938339	18,4177 19,2714	21,1723 22,1537	21,6630
JAB8	6,446021349	93,55397865	18,7709 19,1521	20,0643 20,4717	20,2680
JAB16	6,535520592	93,46447941	17,1757 15,5389	18,3768 16,6254	17,5011
JAB13	6,34832614	93,65167386	18,1293 17,2116	19,3583 18,3783	18,8683
JAB23	6,172812411	93,82718759	19,4462 19,4157	20,7255 20,6930	20,7093
JAB36	6,407572637	93,59242736	19,1592 19,3510	20,4708 20,6758	20,5733
JAB40	6,39326817	93,60673183	16,7958 18,1197	17,9430 19,3573	18,6501
BV13	6,925724197	93,0742758	19,1118 18,4479	20,5339 19,8206	20,1773
BV29	6,711783694	93,28821631	18,0802 16,5118	19,3810 17,6998	18,5404
BV9	7,042419934	92,95758007	17,7176 17,8348	19,0599 19,1860	19,1229
BV28	6,845232577	93,15476742	18,9739 19,3414	20,3681 20,7627	20,5654
BV17	6,746526466	93,25347353	20,7281 20,5514	22,2277 22,0382	22,1329
BV33	6,754138612	93,24586139	17,4334 17,5042	18,6962 18,7721	18,7341
BV16	6,724378061	93,27562194	18,8762 17,9765	20,2370 19,2725	19,7548
BV24	6,638133257	93,36186674	18,5295 19,4113	19,8470 20,7915	20,3192
BV1	6,841401279	93,15859872	17,0623 17,9723	18,3153 19,2921	18,8037
BV23	6,939673686	93,06032631	17,2874 16,8514	18,5765 18,1080	18,3423
BV22	6,697906136	93,30209386	20,4944 18,8551	21,9656 20,2087	21,0872
BV11	7,06492278	92,93507722	19,3246 18,4964	20,7937 19,9025	20,3481

BV4	6,743396533	93,25660347	17,8491 18,1151	19,1398 19,4250	19,2824
BV31	6,898531179	93,10146882	18,1372 17,8574	19,4811 19,1806	19,3308
BV14	6,928100002	93,0719	20,3746 19,8865	21,8912 21,3668	21,6290
BV15	6,77890408	93,22109592	17,8802 17,4831	19,1804 18,7544	18,9674
BV3	6,904418482	93,09558152	17,9059 17,9319	19,2338 19,2618	19,2478
BV2	6,989230081	93,01076992	18,9444 17,2826	20,3680 18,5813	19,4747
BV30	6,972891684	93,02710832	16,3308 16,1433	17,5548 17,3533	17,4541
BV8	6,532336039	93,46766396	17,5798 17,5553	18,8084 18,7822	18,7953
BV5	6,585340193	93,41465981	14,3697 14,3177	15,3827 15,3271	15,3549
BV32	6,522871272	93,47712873	17,2516 17,1955	18,4554 18,3955	18,4254
BV21	6,602574484	93,39742552	17,0278 16,5088	18,2315 17,6759	17,9537
BV25	6,428348283	93,57165172	17,4430 18,0907	18,6413 19,3335	18,9874
BV12	6,670905884	93,32909412	16,4531 16,6893	17,6292 17,8822	17,7557
BV10	6,559325669	93,44067433	15,7547 17,7695	16,8606 19,0169	17,9388
BV6	6,614826435	93,38517356	15,6418 15,5601	16,7497 16,6623	16,7060
BV20	6,563348368	93,43665163	19,4161 17,7542	20,7799 19,0014	19,8907
BV26	6,486637694	93,51336231	17,1404 17,0921	18,3293 18,2778	18,3035
BV7	6,461828574	93,53817143	18,9191 19,9671	20,2261 21,3465	20,7863
BV18	6,529437466	93,47056253	18,5876 16,5373	19,8861 17,6925	18,7893
BV27	6,64851216	93,35148784	17,9515 16,6025	19,2300 17,7850	18,5075
BVV17	6,27082423	93,72917577	22,6258 20,4637	24,1395 21,8328	22,9861
BVV41	6,30459233	93,69540767	17,5477 18,4234	18,7284 19,6630	19,1957

BVV48	6,291659209	93,70834079	16,5496 17,0815	17,6607 18,2284	17,9445
BVV25	5,97582849	94,02417151	19,5693 20,3627	20,8130 21,6569	21,2350
BVV60	6,642922886	93,35707711	18,0975 17,4247	19,3853 18,6646	19,0249
BVV23	6,18391797	93,81608203	18,3829 16,9606	19,5946 18,0785	18,8366
BVV9	6,094813017	93,90518698	18,4397 16,8782	19,6365 17,9737	18,8051
BVV34	6,401887614	93,59811239	16,7242 16,8731	17,8680 18,0272	17,9476
BVV6	6,19951582	93,80048418	16,9789 18,1988	18,1011 19,4016	18,7514
BVV18	6,211861712	93,78813829	18,0667 17,4459	19,2633 18,6014	18,9324
BVV7	6,73956598	93,26043402	15,4434 15,8903	16,5594 17,0386	16,7990
BVV45	6,512665075	93,48733493	19,2231 15,9491	20,5623 17,0601	18,8112
BVV27	6,582320657	93,41767934	16,4608 16,3844	17,6206 17,5389	17,5798
BVV58	6,153946154	93,84605385	19,7353 17,1236	21,0294 18,2465	19,6379
BVV44	6,860368646	93,13963135	15,2577 15,1850	16,3816 16,3035	16,3425
BVV42	6,819395673	93,18060433	20,4194 19,1352	21,9137 20,5356	21,2247
BVV40	6,771572073	93,22842793	15,0819 15,9246	16,1774 17,0813	16,6293
BVV28	7,100944446	92,89905555	14,3718 14,6196	15,4703 15,7370	15,6037
BVV52	6,745324028	93,25467597	16,3988 15,2788	17,5850 16,3840	16,9845
BVV56	6,365763178	93,63423682	16,3499 18,3730	17,4615 19,6221	18,5418
BVV10	6,206370382	93,79362962	18,2942 19,2505	19,5047 20,5243	20,0145
BVV31	6,338054074	93,66194593	18,4590 17,3316	19,7082 18,5044	19,1063
BVV3	6,287866839	93,71213316	16,1390 17,6690	17,2219 18,8545	18,0382
BVV55	6,041823281	93,95817672	18,9594 18,0308	20,1785 19,1902	19,6844

BVV54	6,342448133	93,65755187	18,8188 18,4257	20,0932 19,6735	19,8833
BVV29	6,021996002	93,978004	21,2920 20,8398	22,6563 22,1752	22,4158
BVV8	6,015469359	93,98453064	20,0904 19,0060	21,3763 20,2225	20,7994
BVV14	6,389313418	93,61068658	17,4109 17,5488	18,5992 18,7465	18,6729
BVV38	6,432149832	93,56785017	16,5461 16,6683	17,6836 17,8142	17,7489
BVV16	5,856406298	94,1435937	20,7271 20,2973	22,0165 21,5599	21,7882
BVV32	6,364356298	93,6356437	16,3384 19,3771	17,4489 20,6942	19,0716
BVV4	6,485600594	93,51439941	13,9322 13,7442	14,8985 14,6974	14,7980
BVV36	0,476003597	99,5239964	19,1058 17,9491	19,1972 18,0350	18,6161
BVV1	6,670881993	93,32911801	18,2942 18,2841	19,6018 19,5909	19,5964
BVV47	6,613631603	93,3863684	16,0374 17,3772	17,1732 18,6079	17,8905
BVV2	6,70718807	93,29281193	16,6358 15,3161	17,8319 16,4172	17,1245
BVV33	6,639627646	93,36037235	17,8601 17,7770	19,1302 19,0413	19,0858
BVV59	6,594652103	93,4053479	18,8178 18,7059	20,1463 20,0266	20,0864
BVV20	6,716220336	93,28377966	14,0697 15,0103	15,0827 16,0911	15,5869
BVV49	6,391565611	93,60843439	18,1454 18,5687	19,3844 19,8366	19,6105
BVV51	6,744707421	93,25529258	14,9064 15,5071	15,9845 16,6287	16,3066
BVV13	6,632630336	93,36736966	15,7412 15,4290	16,8594 16,5250	16,6922
BVV46	6,358952746	93,64104725	17,8075 17,3830	19,0168 18,5635	18,7901
BVV37	6,381537739	93,61846226	15,7692 15,4457	16,8441 16,4986	16,6713
BVV24	6,399043741	93,60095626	14,5006 15,0100	15,4920 16,0361	15,7640
BVV12	6,172936357	93,82706364	17,7953 16,0941	18,9661 17,1530	18,0595

BVV15	6,210118944	93,78988106	17,3716 17,8231	18,5219 19,0033	18,7626
BVV35	5,850727778	94,14927222	17,1763 16,2482	18,2437 17,2580	17,7508
BVV22	6,070081039	93,92991896	16,8485 17,0061	17,9374 18,1050	18,0212
BVV21	6,148896747	93,85110325	17,2348 17,8931	18,3640 19,0654	18,7147
BVV5	6,347200914	93,65279909	16,9189 17,1456	18,0656 18,3076	18,1866
BVV30	6,334737447	93,66526255	17,9838 16,0320	19,2001 17,1162	18,1581
EB37	6,246070572	93,75392943	14,3828 13,9091	15,3410 14,8358	15,0884
EB80	6,447760889	93,55223911	14,9895 16,3540	16,0226 17,4811	16,7519
EB62	5,779502236	94,22049776	17,8716 17,0098	18,9678 18,0532	18,5105
EB78	6,171783147	93,82821685	18,0451 16,1255	19,2320 17,1862	18,2091
EB69	6,07554765	93,92445235	17,0849 17,1401	18,1900 18,2488	18,2194
EB6	6,181523682	93,81847632	19,3455 18,3624	20,6201 19,5722	20,0962
EB27	5,983922923	94,01607708	17,2615 17,1863	18,3602 18,2802	18,3202
EB63	6,40372111	93,59627889	20,8484 18,4232	22,2749 19,6837	20,9793
EB20	5,70399685	94,29600315	16,7218 16,8985	17,7333 17,9207	17,8270
EB64	5,942882472	94,05711753	18,5686 17,7717	19,7419 18,8946	19,3182
EB28	5,715725462	94,28427454	17,6251 16,3931	18,6935 17,3869	18,0402
EB46	5,647660069	94,35233993	17,3531 15,1073	18,3918 16,0115	17,2017
EB4	6,064337096	93,9356629	13,9794 13,8340	14,8819 14,7271	14,8045
EB25	5,622875991	94,37712401	15,9722 16,1809	16,9238 17,1449	17,0344
EB10	5,592375262	94,40762474	18,3913 18,5513	19,4807 19,6502	19,5655
EB13	6,069955295	93,93004471	16,6395 15,7211	17,7148 16,7370	17,2259

EB61	5,746977493	94,25302251	17,7030 16,7922	18,7825 17,8161	18,2993
EB33	5,876103188	94,12389681	17,9284 16,0590	19,0476 17,0616	18,0546
EB71	6,005327544	93,99467246	16,8070 16,4651	17,8808 17,5171	17,6989
EB86	6,042699879	93,95730012	16,2460 15,7718	17,2909 16,7861	17,0385
EB55	5,926792948	94,07320705	16,8636 17,5473	17,9261 18,6528	18,2895
EB85	6,145134979	93,85486502	17,9766 17,8157	19,1536 18,9822	19,0679
EB16	6,070321081	93,92967892	16,5342 16,4067	17,6027 17,4670	17,5349
EB35	5,956448615	94,04355139	16,6454 16,9759	17,6997 18,0511	17,8754
EB59	5,943401742	94,05659826	16,7921 17,0453	17,8532 18,1224	17,9878
EB11	6,0446654	93,9553346	16,4418 16,6395	17,4996 17,7100	17,6048
EB5	6,00518068	93,99481932	13,4046 17,1169	14,2610 18,2104	16,2357
EB90	6,191531203	93,8084688	17,8906 17,9420	19,0714 19,1262	19,0988
EB3	5,883019679	94,11698032	17,8246 15,8553	18,9388 16,8464	17,8926
EB67	5,881913091	94,11808691	16,2178 13,5418	17,2314 14,3881	15,8097
EB1	5,49444911	94,50555089	17,5661 18,0032	18,5874 19,0499	18,8187
EB43	5,337723453	94,66227655	15,6706 16,1600	16,5543 17,0712	16,8127
EB66	5,33964857	94,66035143	17,6717 17,4978	18,6685 18,4848	18,5766
EB58	5,231848295	94,7681517	18,0388 17,8906	19,0347 18,8783	18,9565
EB17	5,432216558	94,56778344	16,3847 15,9721	17,3259 16,8896	17,1077
EB49	5,518304313	94,48169569	15,2073 15,7506	16,0955 16,6706	16,3830
EB51	6,179835827	93,82016417	14,8608 14,6049	15,8396 15,5669	15,7033
EB24	5,940119881	94,05988012	17,3669 15,6910	18,4636 16,6820	17,5728

EB72	6,292759295	93,7072407	16,7383 17,1229	17,8624 18,2727	18,0675
EB21	5,80815897	94,19184103	17,3991 17,2727	18,4720 18,3378	18,4049
EB39	5,666478283	94,33352172	15,5356 15,6400	16,4688 16,5794	16,5241
EB22	5,040085705	94,9599143	16,1526 16,6562	17,0099 17,5402	17,2751
EB12	5,245890417	94,75410958	15,8871 16,2073	16,7666 17,1046	16,9356
EB76	5,652712593	94,34728741	15,8863 15,7262	16,8382 16,6684	16,7533
EB75	5,43676149	94,56323851	16,6877 16,7887	17,6471 17,7539	17,7005
EB70	6,227520091	93,77247991	18,7471 18,8116	19,9921 20,0609	20,0265
EB19	6,361627773	93,63837223	16,7480 17,4049	17,8858 18,5874	18,2366
EB34	5,892293341	94,10770666	15,1888 16,2121	16,1398 17,2272	16,6835
EB18	5,437655443	94,56234456	17,4716 16,8187	18,4763 17,7858	18,1310
EB60	5,482551761	94,51744824	16,8604 17,2789	17,8384 18,2812	18,0598
EB45	5,969703537	94,03029646	18,2404 16,8948	19,3985 17,9674	18,6829
EB84	6,119872428	93,88012757	16,5614 16,5635	17,6410 17,6432	17,6421
EB32	5,938672312	94,06132769	15,6882 15,9108	16,6787 16,9153	16,7970
EB57	5,978247776	94,02175222	15,7786 15,6929	16,7819 16,6907	16,7363
EB44	6,081345924	93,91865408	18,8870 17,5909	20,1100 18,7300	19,4200
EB23	5,698334464	94,30166554	15,5135 15,1234	16,4510 16,0373	16,2441
EB68	5,342151762	94,65784824	16,9139 16,9569	17,8685 17,9139	17,8912
EB9	5,777768132	94,22223187	16,3483 15,9491	17,3508 16,9272	17,1390
EB87	5,77892391	94,22107609	15,2665 14,3436	16,2029 15,2234	15,7131
EB30	5,532197305	94,4678027	17,4591 17,6877	18,4815 18,7236	18,6025

EB83	6,031454701	93,9685453	16,1679 16,9762	17,2056 18,0658	17,6357
EB65	6,029303442	93,97069656	16,0165 17,4518	17,0442 18,5715	17,8078
EB41	5,68535321	94,31464679	14,3051 17,0259	15,1674 18,0522	16,6098
EB31	5,992283443	94,00771656	14,3841 14,8137	15,3010 15,7580	15,5295
EB81	6,146134366	93,85386563	15,9558 14,5742	17,0007 15,5286	16,2646
EB14	6,102173498	93,8978265	14,7832 14,7044	15,7440 15,6600	15,7020
EB82	5,907100519	94,09289948	16,2765 15,8725	17,2983 16,8690	17,0836
EB40	5,955868329	94,04413167	17,8638 15,9733	18,9951 16,9849	17,9900
EB47	5,685767549	94,31423245	16,4922 15,3616	17,4865 16,2877	16,8871
EB74	6,955561479	93,04443852	13,9812 11,9933	15,0264 12,8899	13,9581
EB53	6,383528283	93,61647172	15,4520 15,1844	16,5056 16,2198	16,3627
EB77	6,412353123	93,58764688	15,1718 17,5350	16,2113 18,7364	17,4739
EB8	7,255178809	92,74482119	16,3774 15,7009	17,6586 16,9291	17,2938
EB36	6,534634435	93,46536556	17,6449 17,9928	18,8786 19,2507	19,0646
EB29	6,264184565	93,73581544	18,2430 15,5407	19,4621 16,5793	18,0207
EB42	7,013214512	92,98678549	17,8016 15,6565	19,1442 16,8373	17,9908
EB79	6,342465101	93,6575349	14,5017 15,0719	15,4838 16,0926	15,7882
EB88	6,37696412	93,62303588	15,7340 13,3702	16,8057 14,2808	15,5433
EB48	6,548294716	93,45170528	16,5668 16,5129	17,7276 17,6700	17,6988
EB52	6,30831854	93,69168146	15,5923 14,3972	16,6422 15,3666	16,0044
EB15	6,414529894	93,58547011	13,6010 14,3307	14,5333 15,3130	14,9231
EB2	7,04540516	92,95459484	17,2083 17,1825	18,5126 18,4848	18,4987

TABELA 3: Estatística descritiva dos parâmetros químicos de grãos de soja utilizada na calibração e validação.

Software Opus 7.0 Calibração e Validação					
Parâmetros	Min (%)	Max (%)	Méd (%)	DP	Nº
Umidade	5,16	8,28	6,57	0,68	241
Óleo	14,64	23,76	18,83	1,95	254

Min – mínimo, Max – máximo, Méd – média, DP – desvio padrão

3.2 Espectros NIR e desenvolvimento dos modelos de calibração e validação

Na Figura 1, todos os espectros são apresentados, sem qualquer pré-tratamento, na região do infravermelho próximo, obtida a partir de 262 amostras de soja, na faixa de 12.000 a 4.000 cm^{-1} .

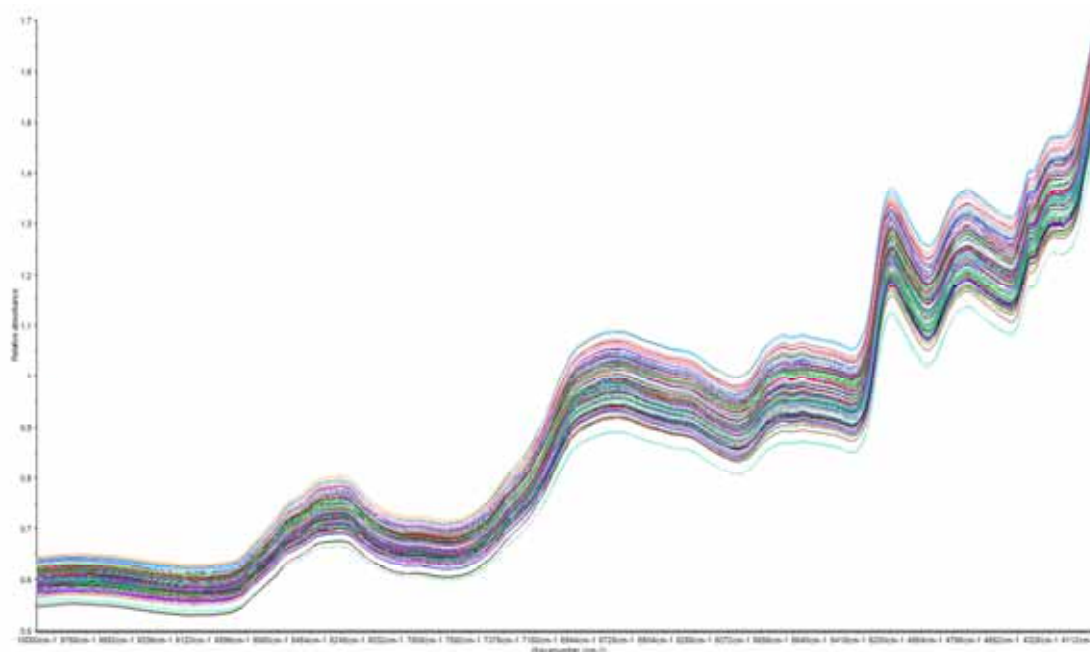


Figura 1: Espectros de infravermelho próximo das amostras de grãos inteiros de soja obtidos na faixa de 12.000 a 4.000 cm^{-1}

Entre os pré-tratamentos aplicados, o que apresentou melhor desempenho na eliminação do efeito de espalhamento da luz foi a primeira derivada utilizando o método Savitzky-Golay (1SG) para o teor de umidade na faixa de 10.552 a 6.024 e 5.392 a 4.496. Para o percentual de óleo, o melhor pré-tratamento utilizado foi o SNV na faixa de 10.553 a 4.492. Na Tabela 4 podem ser observados os resultados dos pré-tratamentos nos modelos desenvolvidos de calibração e validação.

TABELA 4: Pré-tratamentos utilizados para a construção do modelo.

Software Opus 7.0								
Pré-tratamentos	Umidade				Óleo			
	RMSEC (%)	RMSECV (%)	R ^{2C} (%)	R ^{2CV} (%)	RMSEC (%)	RMSECV (%)	R ^{2C} (%)	R ^{2CV} (%)
ST	0,34	0,39	74	66	1,28	1,36	48	42
MSC	0,34	0,40	74	65	1,27	1,35	57	51
SNV+1SG	0,35	0,41	73	63	1,25	1,37	58	50
2SG	0,32	0,40	77	65	1,29	1,36	56	51
1SG	0,33	0,38	76	68	1,27	1,35	57	51
SNV	0,35	0,40	73	64	1,27	1,33	57	53

RMSEC – erro de calibração, RMSECV – erro de validação, R² – coeficiente de determinação

Para a seleção dos modelos de calibração mais ajustados, os valores dos coeficientes de determinação de calibração (R²), RMSEC e RMSECV devem ser considerados. Primeiro deve-se escolher os modelos de calibração com elevado coeficiente de determinação. Este parâmetro é utilizado para uma avaliação prévia dos modelos. O próximo parâmetro para análise do ajuste do modelo é o RMSEC, que é uma medida de como o modelo de calibração ajusta o próprio conjunto de calibração, sendo um parâmetro pouco informativo sobre o futuro desempenho do modelo. Porém, a melhor estimativa do futuro desempenho dos modelos de calibração é o RMSECV, por produzir resultados mais realistas e independentes dos dados empregados na construção dos modelos. Um bom modelo deve apresentar baixo valor de RMSECV (PASQUINI et al., 2003), o que também foi obtido para os dois modelos de calibração.

O melhor modelo para prever a composição dos parâmetros avaliados no grão de soja foi escolhido com base nos resultados mais baixos de RMSECV e nos resultados mais elevados de R^{2CV}, de acordo com as recomendações de WINDHAM et al., 1989.

Os resultados foram utilizados para avaliar a eficiência na predição do teor de umidade e percentual de óleo das amostras de grão de soja e são apresentados na Tabela 5.

TABELA 5: Resultados dos modelos PLS por espectroscopia no infravermelho próximo dos parâmetros avaliados de soja.

Software Opus 7.0							
	LV	R ^{2C}	RMSEC (%)	R ^{2CV}	RMSECV (%)	RPD _C	RPD _{CV}
Umidade	8	76	0,33	68	0,38	2,05	1,78
Óleo	9	57	1,27	53	1,33	1,55	1,42

RMSEC – erro de calibração, RMSECV – erro de validação, R² – coeficiente de determinação, RPD -

Todos os modelos apresentaram uma boa correlação entre os valores de referência e os valores previstos pelo NIR. Todos os erros de regressão foram baixos, demonstrando a capacidade de prever as características químicas de soja pela metodologia NIR. De acordo com as expectativas, os erros do grupo de validação (RMSECV) foram maiores do que os erros do grupo de calibração (RMSEC).

Os erros de calibração e validação para o teor de umidade no Software OPUS 7.0 foram de 0,33% para RMSEC (Figura 2) e 0,38% para RMSECV (Figura 3). Para o percentual de óleo, os erros de calibração e validação foram de 1,27% para o RMSEC (Figura 4) e 1,33% para RMSECV (Figura 5).

Tais valores de erros foram obtidos devido às poucas variáveis latente (LV) para descrever os modelos (8 LV para teor de umidade e 9 LV para teor de óleo). No entanto, o coeficiente de correlação de calibração foi mais favorável para o modelo do teor de umidade, quando comparado com o modelo de teor de óleo (R^{2C} 76% e 57% respectivamente, pelo Software OPUS 7.0), devido à dificuldade de prever o composto presente no conteúdo inferior e da substância orgânica. O mesmo ocorreu para os modelos de validação para ambos os parâmetros avaliados, onde o coeficiente de correlação de validação para o teor de umidade foi 68% (R^{2CV}) enquanto que para o percentual de óleo foi de 53% (R^{2CV}).

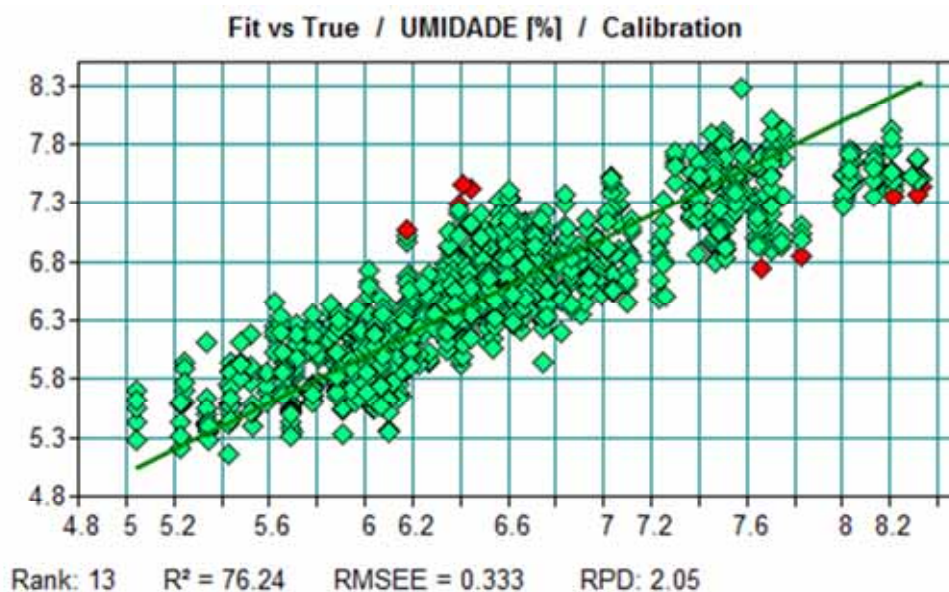


Figura 2: Modelo de calibração por NIR pelo Software OPUS 7.0 e pré-tratamento pela primeira derivada utilizando o método de Savitzky-Golay para teor de umidade em soja.

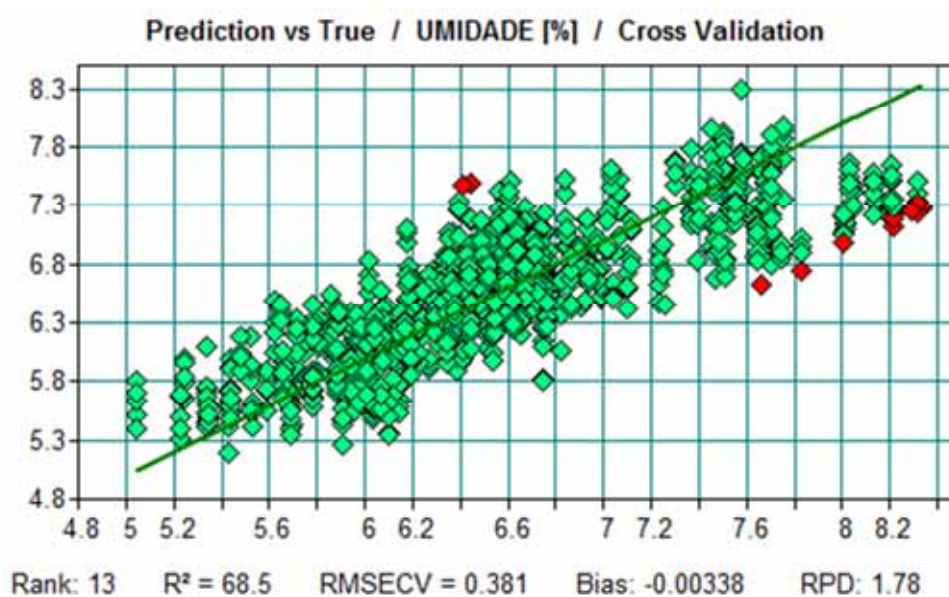


Figura 3: Modelo de validação por NIR pelo Software OPUS 7.0 e pré-tratamento pela primeira derivada utilizando o método de Savitzky-Golay para teor de umidade em soja.

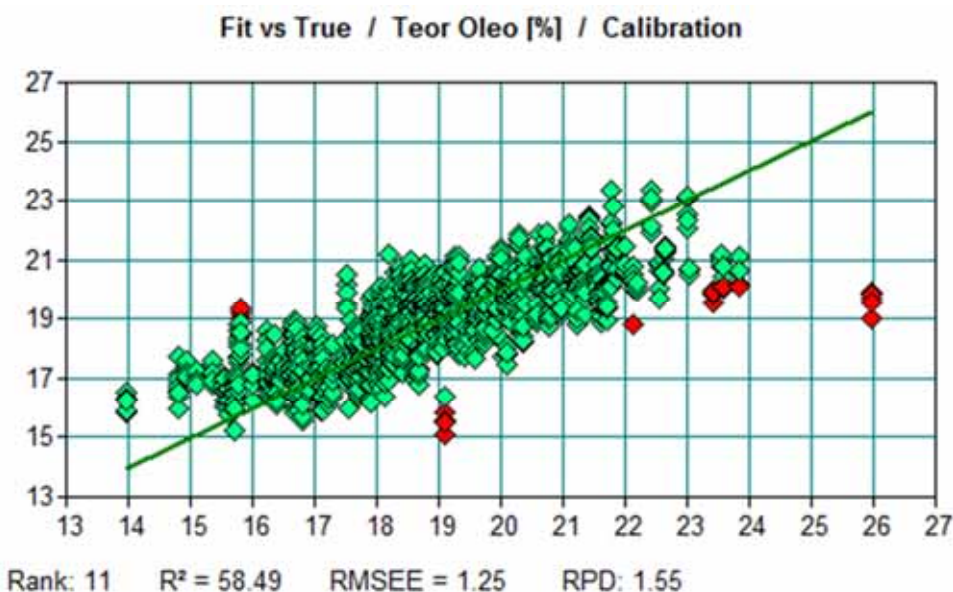


Figura 4: Modelo de calibração por NIR pelo Software OPUS 7.0 e pré-tratamento pelo SNV para teor de óleo em soja.

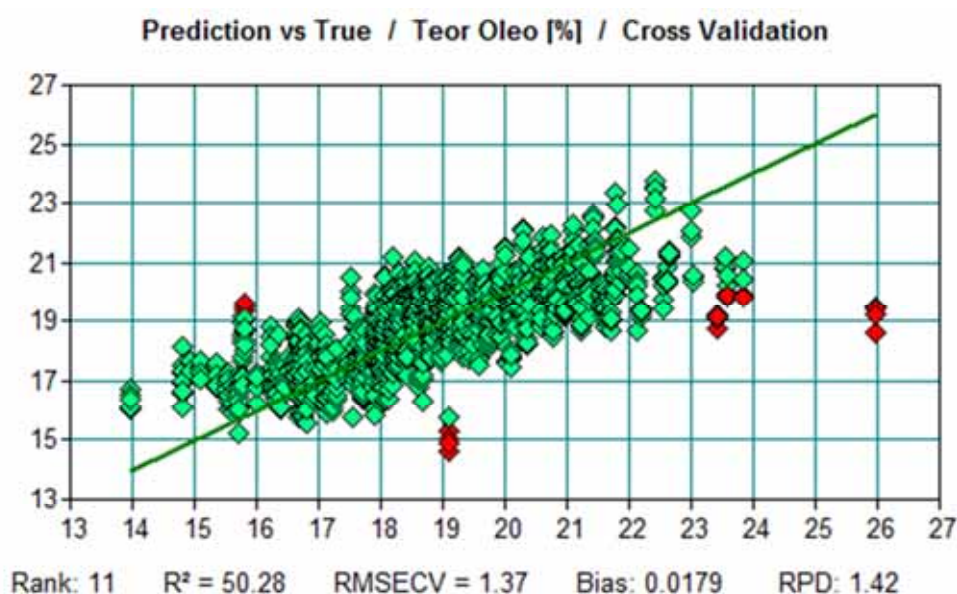


Figura 5: Modelo de validação por NIR pelo Software OPUS 7.0 e pré-tratamento pelo SNV para teor de óleo em soja.

Inúmeros trabalhos já foram desenvolvidos com a finalidade de construir modelos de calibração por espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) nas mais variadas culturas e diversos parâmetros.

Para a cultura da soja, diversos autores vêm elucidando esse tipo de estudo com o intuito de desenvolver modelos de calibração por NIR cada vez mais precisos para os componentes de teor de umidade, percentual de óleo, cinzas, e proteína

como também a composição do fracionamento do teor de óleo (ácidos graxos) entre outros.

Diversos autores utilizaram praticamente as mesmas faixas de leituras como também regiões espectrais de comprimento de ondas semelhantes das amostras para obtenção dos modelos de calibração tanto para o teor de umidade como também para o percentual de óleo e outros parâmetros.

Estudos realizados com farinha de soja para a construção do modelo de calibração de proteína, a região utilizada de comprimento de onda foi de 4.000 cm^{-1} a 9.090 cm^{-1} com conteúdo de proteína variando de 35% a 41,5% para a construção dos modelos de calibração e concentrações variando de 35,7% a 40,4% de proteína para a construção dos modelos de validação. Para o modelo de calibração os valores de coeficiente de determinação (R^2) e do RMSEC foram, respectivamente, 73,2% e 0,55% enquanto que para o modelo de validação o R^2 foi de 66,8% e o RMSECV de 0,60% (DELWICHE et al., 2007).

Em grãos de soja a região de comprimentos de ondas utilizada foi de 4.000 cm^{-1} a 14.000 cm^{-1} para desenvolver um modelo de calibração para conteúdo de proteína. O R^2 obtido para o modelo de calibração foi de 89,2% e o RMSEC de 0,49%, enquanto para o modelo de validação o R^2 e RMSECV foram de 79,1% e 0,66% respectivamente (PANERO et al., 2008).

Desenvolvimento de modelos de calibração para teor de umidade, óleo e proteína em grãos de soja, foi utilizado a região espectral na faixa de 4.000 cm^{-1} a 10.000 cm^{-1} e concentrações de 8,9% a 14,6%, 16% a 20,8% e 32,5% a 39,6% respectivamente. Para os conjuntos de calibração o R^2 e RMSEC foram de 98% e 0,19% para o teor de umidade, 85% e 0,49% para o percentual de óleo e 87% e 0,67% para proteína. O RMECV para ambos os parâmetros foram de 0,23%, 0,53% e 0,73% respectivamente (HEIL, 2010).

Em estudos realizados com regiões espectrais utilizadas nas leituras das amostras, em número de ondas, foram de 4.000 cm^{-1} a 10.000 cm^{-1} para umidade, 4.000 cm^{-1} a 9.500 cm^{-1} para óleo e 4.000 cm^{-1} a 9.500 cm^{-1} para proteína e apresentavam faixa de concentração de 8,82% a 11,18% de umidade, 11,92% a 22,13% de óleo e 26,60% a 47,48% de proteína para a construção dos modelos de calibração dos respectivos parâmetros. Enquanto que as amostras utilizadas para a

construção dos modelos de validação as concentrações variaram de 6,48% a 11,62%, 15,56% a 22,27% e 33,63% a 41,90% respectivamente. Para os conjuntos de calibração e validação o R^2 de calibração e RMSEC, como também o R^2 e RMECV foram de 99,7% e 0,12%; 99% e 0,24% respectivamente para o teor de umidade. Para o percentual de óleo foram de 98,8% e 0,42%; 95% e 0,56% respectivamente, enquanto que para teor de proteína foram encontrados valores de calibração com R^2 de 99,8% e RMSEC de 0,20% e R^2 de 95% e RMSECV de 0,53% para o modelo de validação (Barros, 2011).

Genótipos brasileiros de soja foram utilizados na metodologia NIR para a avaliação do teor de umidade. O R^2 obtido na construção do modelo de calibração foi de 80% entretanto valores de erro de calibração e predição foram superiores aos obtidos no presente estudo (2,30% e 1,55% respectivamente) (Ferreira et al., 2013).

O uso dessa técnica de espectroscopia no infravermelho próximo em produtos agropecuários abrange produtos e aplicações das mais diversas possíveis. Desta forma, foram descritos trabalhos sobre qualidade e segurança alimentar, discriminação de grãos de café, algodão, milho, arroz, etc, qualidade de leite e seus derivados, além da qualidade da carne, madeira, resíduos, detecção de fraudes, bem como a fração de ácidos graxos na produção de biodiesel.

Em girassol, autores construíram um modelo para avaliação do percentual de óleo em genótipos de girassol utilizando a metodologia NIR e obtiveram um R^2 de 88% entretanto o valor de erro de calibração foi de 1,76% (GRUNVALD et al., 2009).

Um modelo de calibração foi desenvolvido para predição do teor de óleo em pinhão-mansão sendo que o melhor modelo (modelo de ajuste dos parâmetros desejados utilizou como pré-tratamento a primeira derivada pelo método de Savitzky-Golay e as regiões selecionadas para a construção desse modelo foram 8.344 a 7.736 cm^{-1} , 6.072 a 4.968 cm^{-1} e 4.520 a 3.976 cm^{-1} ; valor de R^2 de 71,26% e RMSEC de 0,138 (CORREA, 2014).

Modelos de calibração por NIR foram desenvolvidos em programas de melhoramento genético de café para avaliar ácidos clorogênicos, proteínas, cafeína, lípidios, compostos fenólicos, sacarose e açúcares totais. Todos Os modelos foram eficazes em discriminar acessos de café e podem ser utilizados para identificar as

linhagens de café com características mais desejáveis em programas de melhoramento genético (SCHOLZ, 2014).

De forma geral, os modelos construídos tanto para o teor de umidade quanto para o percentual de óleo apresentaram uma boa correlação entre os espectros e os valores de referência e erros relativamente baixos. Contudo, há necessidade da incorporação de mais genótipos para aumentar a amplitude dos dados bem como a robustez dos modelos. De acordo com Batten (1998), um modelo de calibração deve conter amostras que representem a variação total da espécie, por isso faz-se necessária a incorporação constante de novos genótipos para maior robustez e amplitude do modelo a ser utilizado para as aferições.

O presente estudo demonstrou que é possível realizar a predição de parâmetros de composição das sementes íntegras de soja, em especial o teor de umidade e óleo, por meio da metodologia NIR.

A metodologia proposta no presente trabalho para desenvolver um modelo de calibração via NIR, verificando a qualidade da soja, tem um elevado potencial para utilização tanto para as indústrias como também em programas de melhoramento.

O desenvolvimento de modelos de espectroscopia por infravermelho próximo (NIR) para fins de utilização em fases iniciais e avançadas de programas de melhoramento genético é de suma importância, permitindo a seleção de genótipos superiores para importantes parâmetros agrônômicos e de qualidade das sementes, sem haver necessidade de destruição das mesmas.

4 CONCLUSÃO

A curva de calibração de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) obtida no presente estudo apresentou robustez quanto à predição dos teores de umidade e óleo em sementes íntegras de soja com boa correspondência entre os valores obtidos pelo NIR e os métodos de referência dos parâmetros avaliados.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNES, R. J.; DHANOA, M. S.; LISTER, S. J. (1989). Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. **Applied Spectroscopy**, Baltimore, v.43, p.772–777, 1989.

BARROS, J. G. A. **Seleção de mutantes para conteúdo de proteína e óleo por espectroscopia do infravermelho próximo em soja submetidos a radiação gama**. 2011. 69f. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

BATTEN, G. D. Plant analysis using near infrared reflectance spectroscopy: The potencial and the limitations. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v. 38, p.697-706, 1998.

BJORSVIK, H. -R.; MARTENS, H. Calibration of NIR instruments by PLS regression. In: CIURCZAK, E. W.; BURNS, D. A. (Ed.). **Handbook of near-infrared analysis**. 3rd ed. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2007. p.189-205.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para Análises de Sementes / Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária – Brasília: Mapa / ACS, 2009, 399p.

BROWN, C. D.; VEGA-MONTOTO, L.; WENTZELL, P. D. Derivative preprocessing and optimal corrections for baseline drift in multivariate calibration. **Applied Spectroscopy**, Baltimore, v.54, p.1055–1068, 2000

CORRÊA, A. A. P. Abordagem multivariada, perfil composicional e construção de curva de calibração para predição do teor de óleo em *Jatropha curcas* L (Dissertação de mestrado em Agronomia – Genética e melhoramento de plantas) – Jaboticabal, 2014.

DELWICHE, S. R.; PORDESIMO, L. O.; PANTHEE, D. R.; PANTALONE, V. R. Assessing Glycinin (11S) and b-Conglycinin (7S) Fractions of Soybean Storage Protein by Near-Infrared Spectroscopy. **J Am Oil Chem Soc**, v 84, p. 1107–1115, 2007.

FERREIRA, D.S.; PALLONE, J.A.L.; POPPI, R.J. Fourier transform near-infrared spectroscopy (FT-NIRS) application to estimate Brazilian soybean [*Glycine max* (L.) Merril] composition. **Food Research International**, Barking, v.51, p.53-58, 2013.

GELADI, P.; MACDOUGALL, D.; MARTENS, H. Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat. **Applied Spectroscopy**, Baltimore, v.39, p.491–500, 1985.

GRUNVALD, A. K.; LEITE, R. S.; TERRA, I. M.; CARVALHO, C. G. P.; MANDARINO, J. M. G.; ANDRADE, C. A. B.; OLIVEIRA, A. C. B.; RAMOS, N. P.; AMABILE, R. F.; GODINHO, V. P. C.; CARVALHO, H. W. L.; OLIVEIRA, I. R.;

AZEVEDO, N. A.; GONÇALVES, S. L. Curva de calibração para predição do teor de óleo pela análise do espectrômetro de infravermelho próximo (NIR) em ensaios de competição de cultivares de girassol no Brasil. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO GIRASSOL, 18.; SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE A CULTURA DO GIRASSOL, 6., 2009, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa ClimaTemperado, 2009. p. 51-58.

PANERO, F. S.; PANERO, J. S.; SILVA, H. E. B.; Aplicação de EMSC em infravermelho próximo na determinação de açúcar em marzipan. IN Sociedade Brasileira de Química (SBQ) 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. Campinas-SP: **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Sao Paulo, v. 14,p.198-219, 2003.

SCHOLZ, M. "Aplicação da espectroscopia no infravermelho próximo para o café verde fenotipagem bioquímica", **J. Near Infrared Spectrosc.** 22 (), 0-0 (2014). doi: 10.1255 / jnirs.1134.

WINDHAM, W. R.; MERTENS, D. R.; BARTON, F. E., II. Protocol for NIRS calibration: Sample selection and equation development and validation. In: MARTEN, G. C.; SHENK, J. S.; BARTON, II (Ed.). **Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): analysis of forage quality.** Washginton: USDA-ARS, 1989. (Agriculture Handbook, 643).

CAPÍTULO 3 - MAPEAMENTO DE QTLs PARA TEOR DE ÓLEO EM POPULAÇÕES SEGREGANTES DE SOJA

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi detectar e mapear locos de caracteres quantitativos (QTL) que estejam relacionados ao conteúdo de óleo em soja. Foram utilizadas 244 progênies derivadas do cruzamento bi-parental entre a Linhagem 69 pertencente ao programa de melhoramento genético da UNESP/FCAV e a cultivar Tucunaré. 358 marcadores microssatélites (SSR) foram avaliados quanto ao nível de polimorfismo entre os genitores e os que apresentaram polimórficos foram abertos em todos os indivíduos da população F₂. A avaliação fenotípica do teor de óleo foi realizada com o auxílio do Equipamento Tango-NIR, por espectroscopia do infra vermelho próximo, em sementes únicas e em triplicatas nas progênies F₂. As análises foram processadas pelos programas QTL Cartographer com 56 SSRs polimórficos, onde foram detectados dois QTL associados ao conteúdo de óleo, estando localizados nos grupos de ligação K e H. A variação fenotípica explicada pelos QTL variou de 7,8% a 46,75%, para o conteúdo de óleo. Foram detectados novos QTL associados ao conteúdo de óleo, além dos previamente relatados em outros estudos. Regiões distintas das atualmente conhecidas podem estar envolvidas no controle genético do teor de óleo na soja.

Palavras-chave: *Glycine max*, grupos de ligação, loci para características quantitativas, marcadores moleculares.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja possui uma cadeia produtiva estruturada e ampla adaptação em todo o território nacional, principalmente em função do rápido e contínuo avanço nos programas de melhoramento em andamento em todo o país, permitindo com isso que a cultura possa produzir com igual eficiência em todo o território nacional, promovendo a quebra de fronteiras agrícolas.

Devido ao avanço nos programas de melhoramento genético, nas últimas décadas, inúmeras tecnologias foram introduzidas como ferramentas de forma a acelerar a obtenção de novos cultivares. Dessa forma, o uso de marcadores moleculares constitui uma ferramenta valiosa e de grande potencial para os programas de melhoramento genético permitindo a identificação de genes responsáveis por diversas características de importância agrônômica ou características quantitativas (QTL's – *Quantitative Trait Loci*). Sendo assim, a construção de mapas genéticos de ligação, utilizando marcadores moleculares, pode auxiliar na elaboração de estratégias a serem introduzidas em programas de melhoramento genético de forma a estimar quantos e quais são os QTL's responsáveis pela variação nas características, bem como localizar sua posição no genoma além de estimar seus efeitos e suas inter-relações.

Nesse sentido, uma das aplicações diretas da construção de mapas genéticos é a localização de genes de importância econômica ou locos de características quantitativas. Além do mais, o mapeamento genético possibilita a seleção assistida por marcadores moleculares (SAMM) em programas de seleção e clonagem gênica, reduzindo o tempo e recursos despendidos no desenvolvimento de novos cultivares.

Em soja, o desenvolvimento de marcadores moleculares microssatélites tem sido viabilizado para serem aplicados no mapeamento genético. A utilização desse tipo de marcador permite que genes candidatos, sejam associados a características agrônômicas de interesse. Esses marcadores são considerados ideais para o processo de seleção assistida, pelas várias vantagens associadas aos mesmos (CATO et al 2001).

Os marcadores moleculares microssatélites ou *Simple Sequence Repeat* (SSR) são sequências compostas por 1 a 6 pares de bases que são repetidas lado a

lado (em tandem). Devido à sua natureza, os SSRs são multialélicos, de herança co-dominante, possuem facilidade de detecção pela PCR (reação em cadeia da polimerase), apresentam abundância relativa, cobertura extensiva no genoma e necessidades de quantidades pequenas de DNA no início das reações (POWELL et al. 1996).

Atendendo a uma demanda no mercado por cultivares de soja com alto teor de óleo, tal caráter é amplamente estudado nos programas de melhoramento genético favorecendo a obtenção de cultivares de soja portadores de bons caracteres agrônômicos, de ciclo precoce e com alto teor de óleo agregado substituindo os cultivares obsoletos já existentes. Tal fato assume grande importância, principalmente em áreas canavieiras como opção para cultivo em áreas de reforma de canavial, bem como para a produção de biodiesel.

Dentro desse contexto, a presente pesquisa tem como objetivo o mapeamento de QTL's associados ao conteúdo de óleo na soja, em populações $F_{2:3}$ derivadas do cruzamento entre linhagens precoces e adaptadas ao sistema de rotação cana-soja (baixo teor de óleo) e genótipos não adaptados a este sistema (alto teor de óleo), visando a utilização de tais QTL's no processo seletivo de populações segregantes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Atividades em casa-de-vegetação

Escolha dos parentais e desenvolvimento das populações segregantes

Foram efetuados os cruzamentos artificiais (hibridação) em casa-de-vegetação, visando a síntese das novas populações a serem utilizadas para o mapeamento bem como para a obtenção e seleção de novos genótipos de soja com aptidão para o cultivo de rotação, destinado às regiões canavieiras do Estado de São Paulo.

Os genitores selecionados para comporem os cruzamentos apresentaram precocidade, características agrônômicas superiores, boa resistência as principais doenças da cultura da soja, além de bom conteúdo de óleo nas sementes. Tais

populações sintetizadas foram utilizadas para o mapeamento genético bem como para o início de seleção de genótipos superiores para os caracteres visados no presente trabalho. Os genótipos que foram utilizados como fonte para o caráter precocidade e superioridade agronômica são pertencentes ao programa de melhoramento genético de soja da UNESP – Campus Jaboticabal, os quais obtiveram os melhores resultados em ensaios de estratificação ambiental, dentre um conjunto de linhagens avaliadas. Sendo assim, utilizado um cruzamento para o mapeamento de QTL's para alto teor de óleo, sendo os demais cruzamentos utilizados para a continuidade do programa de melhoramento atualmente em andamento, com foco principal na precocidade, alta produtividade e agora sendo incorporado também o alto teor de óleo. Na elaboração dos cruzamentos, foram observados os contrastes dos caracteres, para exploração da maior variabilidade possível. Alguns dos genótipos que foram utilizados como parentais, com algumas características favoráveis descritas, encontram-se listados na Tabela 1. As nove Linhagens citadas (69, 23, 54, 62, 01, 02, 52, 53 e 70) correspondem aos melhores genótipos pertencentes ao programa de melhoramento genético de soja da UNESP/FCAV que encontra-se em andamento, os quais possuem alta produtividade, adaptação ampla às áreas de rotação soja-cana, além de precocidade.

Nesta primeira etapa, foi realizada inicialmente a escolha dos genitores a serem utilizados nas hibridizações artificiais. Para efeito de cruzamento de plantas pertencentes a um programa de melhoramento genético, tais parentais devem apresentar características contrastantes para os caracteres desejados, possibilitando assim uma maior variabilidade genética e o mapeamento do caráter na geração F_2 .

Sendo assim, foram selecionados dois cultivares comerciais com elevado teor de óleo (FMT Tucunaré e UFUs Carajás) contrastando com as linhagens avançadas (baixos teores de óleo), no entanto portadoras de caracteres de interesse agronômico tais como: precocidade, boa resistência às principais doenças, além de adaptação plena às áreas canavieiras e alta produtividade.

As dificuldades em se realizar hibridações artificiais em soja ocorrem devido à sua própria natureza genética. A soja é uma planta autógama, portanto com elevadas taxas de autofecundação. Devido à ocorrência do processo denominado

cleistogamia, a flor é autofecundada antes mesmo do botão floral se abrir, visto que a flor de soja possui estrutura hermafrodita possuindo aparelho reprodutor masculino e feminino na mesma flor. Para que ocorra, então, o intercruzamento, as plantas selecionadas para esta finalidade foram separadas de acordo com os grupos de maturidade existentes e caracterizados para a cultura da soja (ALLIPRANDINI et al., 2009). Desse modo, a semeadura foi realizada com intervalo de 7 a 10 dias de modo a coincidir o período de florescimento entre os genótipos a serem hibridizados (Tabela 1).

Tabela 1: Relação dos genitores utilizados nos cruzamentos com descrição de características importantes para cada genótipo.

Parentais	Ciclo	Característica
Linhagem 69	Até 120 dias (precoce)	Adaptação plena; produtividade
Linhagem 23	Até 120 dias (precoce)	Adaptação plena; produtividade
Linhagem 54	Até 120 dias (precoce)	Adaptação plena; produtividade
Linhagem 62	Até 120 dias (precoce)	Adaptação plena; produtividade
Linhagem 01	Até 120 dias (precoce)	Adaptação plena; produtividade
Linhagem 02	Até 120 dias (precoce)	Adaptação plena; produtividade
Linhagem 52	Até 120 dias (precoce)	Adaptação plena; produtividade
Linhagem 53	Até 120 dias (precoce)	Adaptação plena; produtividade
Linhagem 70	Até 120 dias (precoce)	Adaptação plena; produtividade
FMT Tucunaré	125-130 dias (médio)	Alto teor de óleo
PI 200487 (Kinoshita)	131-140 dias (médio)	Fe (R)
PI 471096 (Orba)	131-140 dias (médio)	Fe (R)
Bragg	131-140 dias (médio)	MI (R), MJ (R)
BRS Sambaíba	131-140 dias (médio)	Fe (MR), CH (R)
MG/BR 46 (Conquista)	131-140 dias (médio)	CH (R), O (R)
IAC 17	Até 120 dias (precoce)	CH (R), O (R)
IAC Foscarin 31	Até 120 dias (precoce)	CH (MR)
BRSMG Confiança	Até 120 dias (precoce)	CH (R), O (R)
BRSMG Renascença	121-130 dias (semiprecoce)	NCS (R 3), CH (R), O (R), MI (R)
BRS 231	121-130 dias (semiprecoce)	NCS (R 3), CH (R)
FMT Matrinxã	121-130 dias (semiprecoce)	NCS (R 1, 3), CH (R), MI(R)
FT-Cometa	Até 120 dias (precoce)	MI (MR), MJ(R)
IAC 23	Até 120 dias (precoce)	CH (R), O (R)
UFUs Carajas	115 dias (precoce)	Alto teor de óleo

R = apresenta reação de resistência a doença, Fe = Ferrugem asiática, MI = Míldio, O = Oídio, MJ = *Meloidogyne javanica*, CH = Cancro da haste, NCS = Nematóide de cisto da soja.

As hibridizações artificiais foram realizadas em casa-de-vegetação climatizada localizada no Departamento de Produção Vegetal da UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP, em diferentes épocas (plantio de verão e inverno) no decorrer do ano 2011. Devido às dificuldades presentes para a obtenção de sementes F_1 nas hibridizações artificiais de soja, foram realizados cinco repetições do experimento de hibridização.

Para todos os ensaios avaliados em casa-de-vegetação, as condições ambientais locais (temperatura e umidade relativa do ar) foram controladas, aproximando-as das condições ambientais de campo.

Em virtude dos genitores apresentarem diferentes comportamentos, a semeadura foi planejada para sincronia de florescimento. Assim, conforme mencionado anteriormente, a semeadura foi realizada em intervalos de 7 a 10 dias, para que existissem flores viáveis de vários genótipos para atuarem como genitores masculinos e/ou, femininos.

Antes mesmo de se realizar o plantio dos genótipos, as sementes foram submetidas à germinação. Para essa condição utilizou-se: caixas para germinação (Gerbox), papel filtro especial para germinação e água Ultra Pura em volume de 2,5 vezes em relação à massa do papel. As sementes de cada genótipo foram dispostas nestas caixas, sendo separadas e devidamente identificadas. As caixas foram mantidas em câmara própria para germinação em temperatura de 25°C durante três dias para embebição e pré-germinação das sementes conforme ilustrado na Figura 1.

Para semeadura foram utilizados vasos plásticos com 5 litros de capacidade, contendo como substrato uma mistura de terra, areia e vermiculita. Foram semeadas 5 sementes por vaso e três vasos para cada genótipo, para, após o desbaste, permanecerem três plantas por vaso. Posteriormente, estas plantas foram tutoradas, para o processo de hibridização.

Os cruzamentos foram realizados por meio da emasculação do genitor feminino e consecutivo contato do pólen do genitor masculino com o estigma do botão floral feminino. Cada botão floral, na oportunidade, foi devidamente etiquetado com a data da elaboração do cruzamento e nomes dos genitores masculino e feminino que fizeram parte do cruzamento.

No decorrer de todos os ensaios de cruzamentos, foram realizadas aplicações de inseticida (Engeo ®) e fungicida (Opera ®) visando o controle de pragas e doenças respectivamente.



Figura 1. Etapas do processo de germinação das sementes em câmara de germinação.

Hibridações artificiais e obtenção das sementes F_1

O experimento foi conduzido em plantio de verão. O período de semeadura foi de 06-12-2010 a 06-01-2011, iniciando com o semeio dos genótipos de ciclo tardio intercalando entre 7 e 10 dias para os demais genótipos com ciclo intermediário e, posteriormente, obedecendo ao mesmo prazo para os genótipos de ciclo precoce. Na fase de florescimento, foram realizadas hibridizações artificiais. As plantas foram tutoradas até a colheita realizada em 15/05/2011.

A Figura 2 ilustra as diversas etapas conduzidas em todos os ensaios de hibridização artificial.

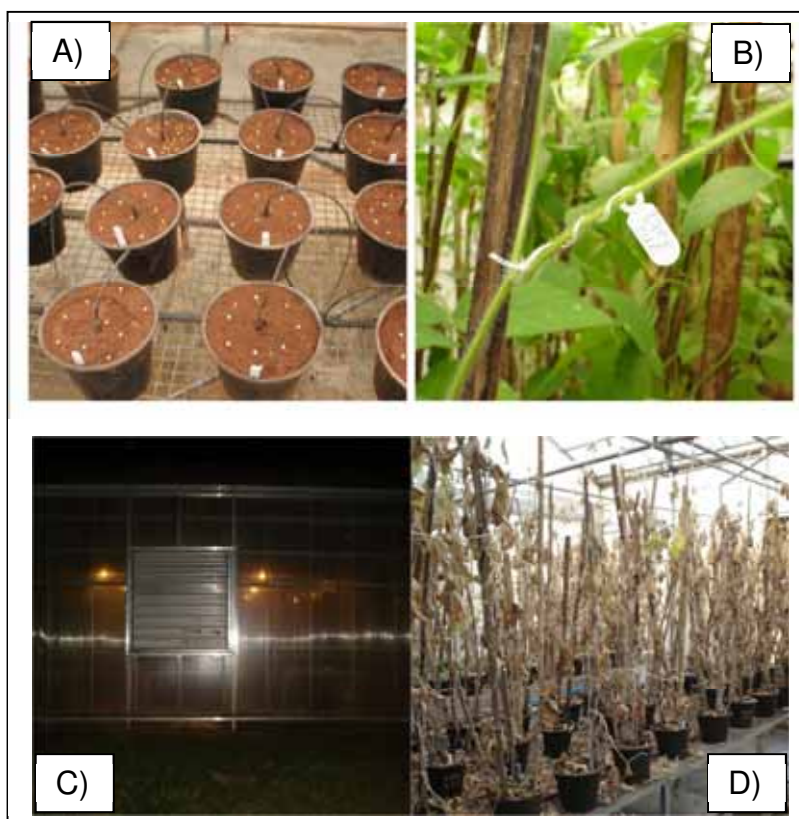


Figura 2. Etapas das atividades nos ensaios em casa-de-vegetação. A) Transplântio das sementes para os vasos na casa-de-vegetação, B) Cruzamentos artificiais realizados e identificados, C) Controle do fotoperíodo em cultivo de inverno da soja, D) Plantas de soja em estágio R8 (colheita).

- **Ensaio da geração F_1**

A semeadura foi realizada no dia 28-01-2012 com todas as sementes oriundas das hibridações artificiais obedecendo aos mesmos critérios realizados nos demais ensaios em casa-de-vegetação. As plantas foram identificadas com os respectivos cruzamentos. No estágio V3 de desenvolvimento, foram coletadas amostras de folhas jovens de plantas para serem avaliadas por meio de marcadores moleculares microssatélites (SSR), pertencentes ao mapa da cultura da soja, sendo cada amostra de planta individual disposta em microtubo de 1,5 mL e armazenada em freezer -80°C , para posterior maceração em nitrogênio líquido e extração de DNA. Nesta etapa foram utilizados 27 SSRs, esta fase de análise possui o objetivo de identificar indivíduos heterozigotos, validando, assim, as hibridações artificiais realizadas.

As plantas foram conduzidas em casa-de-vegetação, visto que aqueles indivíduos que apresentaram a condição heterozigota, quando comparados a seus parentais, nas análises moleculares foram autofecundados, originando indivíduos F_2 (Figura 3). Após a colheita, foram realizadas análises moleculares a fim de se verificar a condição heterozigota das progênes F_1 .



Figura 3: Avanço da geração F_1 em casa-de-vegetação. A) Sementes após o processo de germinação prontas para a semeadura, B) Plantas de soja no estágio V2.

Para a obtenção da geração F_2 , as sementes F_1 foram imediatamente semeadas em vasos, mantidos em condições de casa-de-vegetação até o estágio R_8 (FEHR; CAVINESS, 1977) quando se procedeu a colheita. Este processo foi realizado no menor tempo possível, visando a rápida obtenção das populações para fins de mapeamento.

2.2 Atividades em campo

Avaliação das gerações F_2

As populações composta por 244 progênes F_2 foram cultivadas em campo, sendo utilizadas para fins de mapeamento genético dos QTLs para teor de óleo preditos pelo NIR, e ainda foram avançadas para a geração $F_{3:2}$, onde tais progênes foram caracterizadas fenotipicamente para os vários caracteres de interesse.

Nas plantas de geração F_2 , foram realizadas as coletas de folhas, para as extrações de DNA detalhadas no item de Atividades de Laboratório (item 2.3.1).

As plantas F_2 , que deram origem às sementes F_3 , foram colhidas individualmente, onde uma planta F_2 que produziu sementes F_3 onde cada planta deu origem a uma nova família.

2.3 Atividades em laboratório

2.3.1 Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA genômico total foi obtido do tecido foliar do trifólio mais jovem da planta e moído utilizando o método CTAB, descrito em Ferreira e Grattapaglia (1998), com modificações para a cultura da soja. O DNA de cada indivíduo foi quantificado em Equipamento Nanodrop, verificando-se a concentração e qualidade do mesmo por meio da leitura da absorbância a 260 e 280nm.

A extração de DNA foi realizada na população F_1 para identificação dos indivíduos provenientes dos intercruzamentos, bem como também na população F_2 utilizada para fins de mapeamento genético dos QTL's para teor de óleo.

2.3.2 Análises moleculares em população F_1

Foram realizadas análises por marcadores moleculares SSRs na população F_1 para a identificação dos indivíduos provenientes dos cruzamentos. As reações de amplificação dos marcadores microssatélites foram realizadas adicionando 1X Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8,50 mM KCl) do tampão da enzima; 1,5mM $MgCl_2$; 0,15 μ M de cada dNTP; 0,15 μ M de cada iniciador (Forward e Reverse); 1 unidade de *Taq* Polimerase e 300 ng de DNA genômico, água ultra pura q.s.p 25 μ L.

O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial à 94°C por 7 minutos, seguida de 32 ciclos contendo uma etapa de desnaturação à 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento específica para cada par de *primer* por 1 minuto, extensão à 72°C por 2 minutos, e um ciclo final à 72°C por 7 minutos.

O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose de alta resolução (agarose 1000) a uma concentração de 3%, sendo o mesmo corado com brometo de etídeo na concentração de 10mg/mL. A eletroforese foi realizada a 80V

por cerca de três horas, utilizando tampão TBE 1X. A visualização foi feita em luz UV através do fotodocumentador QUANTUM – ST4 (1100 – 26M EXPRESS) e as imagens cedidas pelo Software QUANTUM ST4.

Foram realizadas reações com 27 marcadores microssatélites de diferentes grupos de ligação que compõem o mapa genético da soja para verificar a heterozigose entre os indivíduos provenientes dos intercrossamentos. Os indivíduos que apresentaram o perfil de bandas (alelos) em duplicidade, demonstraram a eficácia dos cruzamentos e foram identificados e assim selecionados para prosseguir para a próxima geração F₂.

2.3.3 BSA (*Bulked Segregant Analysis*)

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento de Plantas localizado no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' (ESALQ / USP), localizado no município de Piracicaba - SP.

A análise de BSA (*Bulked Segregant Analysis*) é um processo rápido para identificar marcadores em regiões específicas do genoma. O método consiste em agrupar amostras de DNA de indivíduos, em classes específicas, sendo os mesmos oriundos de uma população segregante proveniente de um único cruzamento. No total, para a análise de BSA foram utilizadas 20 progênies, sendo 10 classificadas como alto teor de óleo e 10 com baixo teor de óleo, sendo todas pertencentes à população de mapeamento provenientes do cruzamento entre o cultivar Tucunaré (alto teor de óleo) e a Linhagem 69 (baixo teor de óleo).

Na síntese dos *primers* foi adicionada uma sequência específica para pareamento com fluoróforo, permitindo a genotipagem dos indivíduos em sequenciador automático.

Para reação de amplificação foram utilizados 20 ng do DNA, 10 mM do iniciador *Forward*, 10 mM do iniciador *Reverse*, 10 mM do primer fluorescente (M13), 25 mM de cada dNTP, solução tampão 10X de PCR, 2,5mg/ml do BSA (*Bovine Sorum Albumine*), 25 mM de MgCl₂ e uma unidade da enzima Taq DNA-polimerase em um volume total de 10 µL. A amplificação das regiões microssatélites (PCR) foi

realizada conforme o protocolo: 5 minutos a 94° C, seguidos por 10 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94° C, 1 minuto de pareamento a 50° C e 1 minuto de extensão a 72° C, sendo que após cada ciclo a temperatura de pareamento foi diminuída em 1°C. Em seguida, foram realizados mais 30 ciclos de 40 segundos a 94° C, 40 segundos a 40° C e 1 minuto a 72° C, com extensão final de 10 minutos a 72° C.

Os produtos gerados pela PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes utilizando sequenciador automático 4300S DNA Analysis System (LI-COR Corporate). O tamanho dos alelos foi inferido com base em marcadores comerciais padrão (*ladder*) e as imagens obtidas foram arquivadas para posterior marcação dos alelos e genotipagem com auxílio dos softwares SAGA Lite e SAGA MX Generation (LI-COR Corporate). Os resultados foram conferidos e, quando necessário, a identificação dos alelos foi corrigida manualmente.

2.3.4 Análises moleculares em população F₂

Inicialmente, os locos de microssatélites (SSRs) foram avaliados quanto ao polimorfismo entre os genitores Tucunaré e Linhagem 69. Os locos foram selecionados por apresentarem o maior potencial em gerar marcadores polimórficos e por produzirem padrões de bandas de alta qualidade, sendo assim, avaliados em toda a população de mapeamento.

As reações de PCR e as análises dos géis se procederam da mesma maneira descrita para as análises de BSA.

2.4 Obtenção do Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC)

O conteúdo de informação polimórfica (PIC – *Polymorphism information content*), proposto por Anderson *et al.* (1993), foi calculado em função do número de alelos detectados, da sua distribuição e frequência na população estudada. Isso para se determinar os valores de cada marcador na detecção de polimorfismo entre

as progênies de soja analisadas. Os valores de PIC para cada marcador foram determinados pela fórmula:

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

Nesta expressão, p_{ij} é a frequência do alelo " j " no marcador " i " (a soma se estende por todos os alelos). O cálculo foi baseado no número de alelos detectados por marcador para um determinado loco e a frequência relativa de cada alelo no conjunto das progênies analisadas.

2.5 Construção do mapa de ligação

O mapa de ligação foi elaborado utilizando o programa OneMap (MARGARIDO; SOUZA; GARCIA, 2007). Os grupos de ligação (GL) foram estabelecidos adotando-se um LOD mínimo (*Logarithm of Odds*) de 3.84, para a ligação entre os marcadores, para ordenação das marcas e fração máxima de recombinação (r) de 0,30. A função "order.seq" foi utilizada para determinar qual a melhor ordem dos marcadores dentro de cada grupo de ligação, pois essa função utiliza, automaticamente, as funções "compare" e "try.seq". As distâncias entre os marcadores, dadas em centimorgans (cM) foram estimadas pela função de Kosambi.

2.6 Mapeamento de QTLs para teor de óleo

As análises de detecção e mapeamento de QTL foram realizadas pelos métodos de intervalo composto (CIM – *Composite Interval Mapping* - Zheng, 1994). Foi utilizado o Modelo 6 do *Zmapqtl* como método de seleção de variáveis *Forward and Backward Regression*. A presença do QTL foi avaliada a cada 1cM (centiMorgans) considerando uma janela de 10 cM. O LOD mínimo foi determinado considerando um teste de 1000 permutações a 95% de significância. Todas as

análises foram realizadas através do software QTL Cartographer versão 2.5 (WANG; BASTEN; ZENG, 2005).

2.7 Obtenção do teor de óleo das progênies

O teor de óleo nas sementes foi determinado por um espectrômetro infravermelho próximo (NIR) da marca Bruker modelo Tango. Os espectros de cada semente foram obtidos utilizando a curva de calibração desenvolvida pelo próprio fabricante. A leitura dos espectros foram processadas na faixa entre 11.536 a 3.952 cm^{-1} com 64 scans, 16 cm^{-1} de resolução e intervalo de 8 cm^{-1} .

Foram obtidos os teores do percentual de óleo de todas as sementes F_2 oriundas dos cruzamentos. Por se tratar de populações segregantes, as análises foram efetuadas em sementes individuais e em triplicatas para cada semente. Na geração seguinte, as análises foram confirmadas nas progênies oriundas de cada planta individual (sementes $F_{3:2}$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação de hibridação por marcadores SSRs em progênies F_1

Observando-se a Figura 4, correspondente à amplificação do iniciador Satt 174, pode-se observar que a utilização dos iniciadores microssatélites possibilitou a identificação de indivíduos heterozigotos, certamente provenientes das hibridizações artificiais. No entanto, foi necessária a utilização de um maior número de SSRs na identificação de genótipos e, conforme mencionado, foram realizadas reações com 27 marcadores microssatélites de diferentes grupos de ligação que compõem o mapa genético da soja, sendo apresentada apenas a ilustração de um destes marcadores. Outros marcadores também permitiram claramente a identificação de indivíduos homozigotos e heterozigotos, permitindo a distinção entre as plantas oriundas de autofecundação ou cruzamento. O número de marcadores realizados

para esta análise é em função da efetividade dos mesmos na diferenciação, visto que de acordo com os parentais, a eficiência dos marcadores torna-se alterada para esta diferenciação.

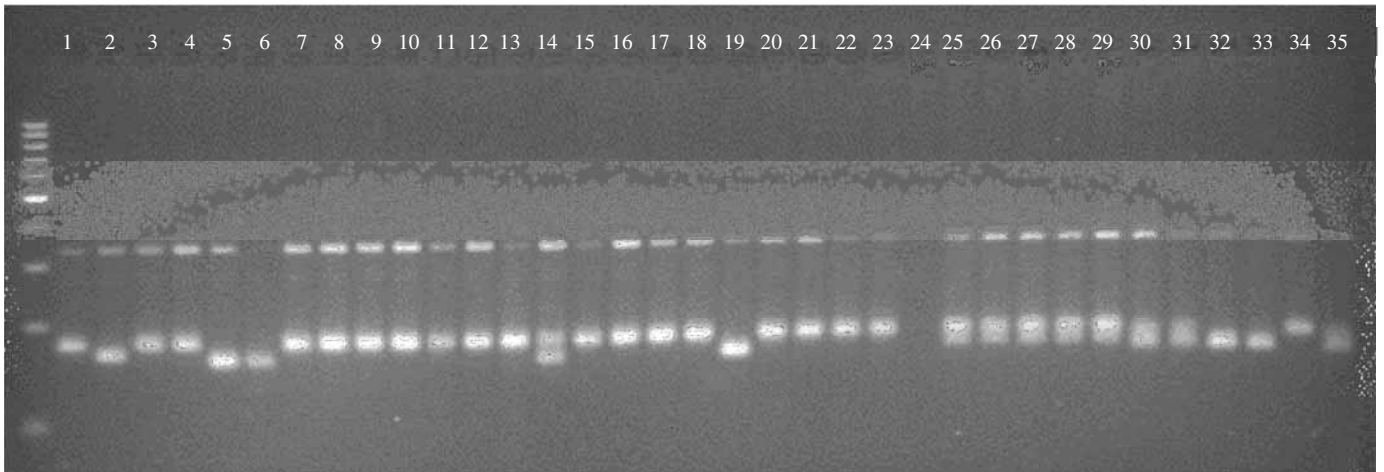


Figura 4: Reação de amplificação do marcador SATT 174 nos 149 genótipos.

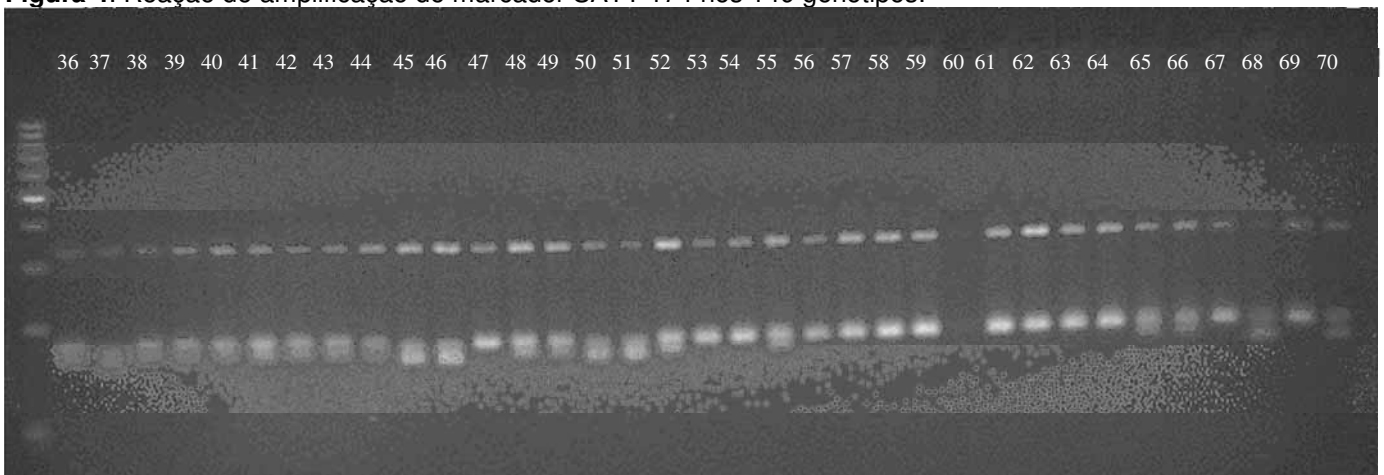


Figura 4: Continuação.

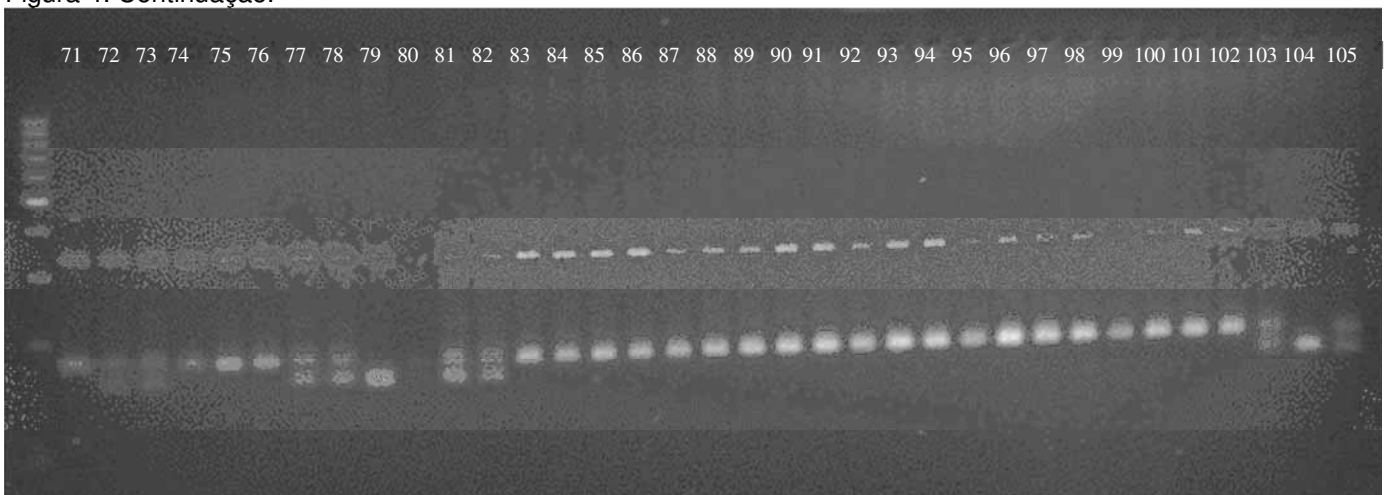


Figura 4: Continuação.

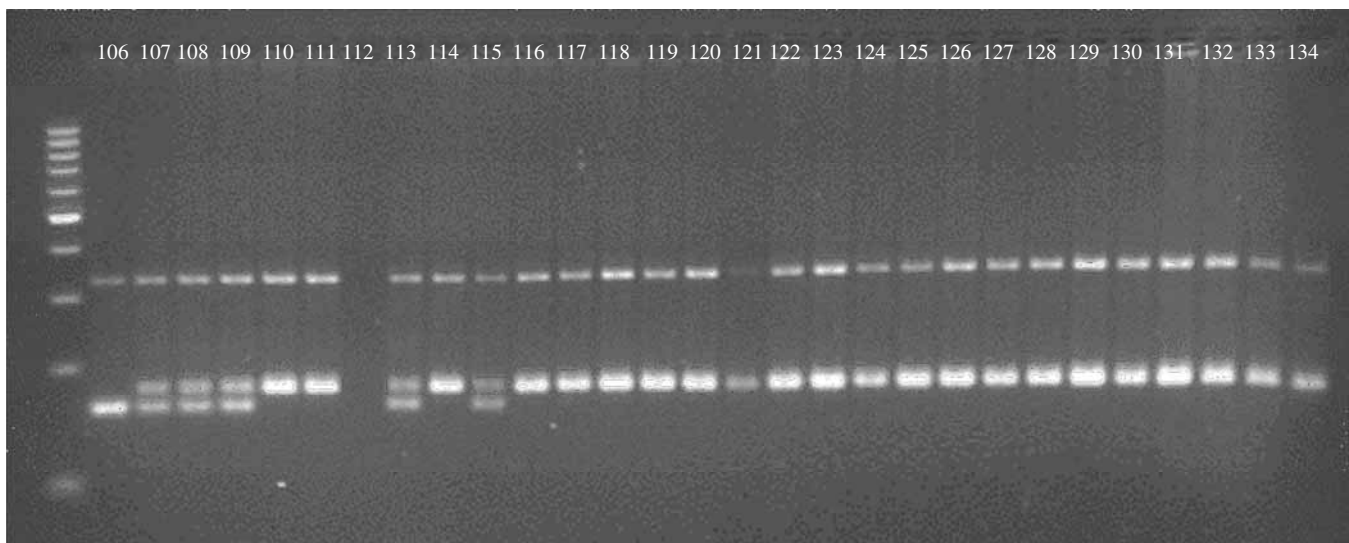


Figura 4: Continuação.

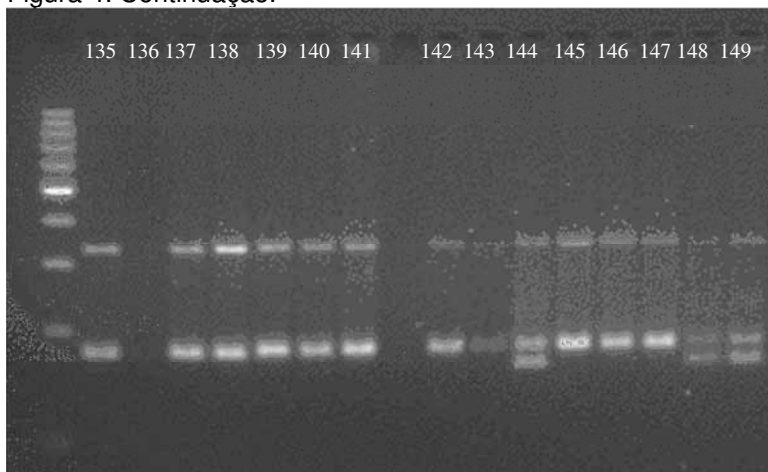


Figura 4: Continuação.

3.2 Avaliação do polimorfismo de marcadores SSRs entre os genitores da população de mapeamento por meio de análises do tipo BSA

A amplificação dos locos microsatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSRs) resulta em locos polimórficos que são extremamente úteis, principalmente, em estudos de mapeamento. Tal polimorfismo aparece quando os alelos diferem quanto ao número de repetições em tandem no segmento amplificado, resultando em fragmentos de diferentes tamanhos visualizados nos géis de eletroforese.

O polimorfismo observado com marcadores do tipo microsatélite, em geral, resulta do ganho ou perda de um motivo na sequência repetitiva. Os pares de primers que flanqueiam esta região repetitiva, por sua vez definem o loco de amplificação (SSRs). Desta forma, os diferentes marcadores observados após a

amplificação via reação PCR com um par de primers SSRs são assumidos como alelos provenientes de um mesmo loco de SSRs (JARNE; LAGODA 1996).

Nesta etapa, para a BSA da população segregante pertencente ao C23 (Tucunaré x Linhagem 69) que foi utilizada para o mapeamento de QTL's, foram utilizados 358 SSR (*Simple Sequence Repeats*), selecionados com base na sua distribuição ao longo de todos os 20 grupos de ligação do genoma da soja para avaliar quanto ao nível de polimorfismo entre os genitores pertencentes a esse cruzamento bem como, a possível relação entre alto e baixo óleo, os quais foram avaliados nos indivíduos dos bulks.

Do total de 358 SSRs avaliados na análise de BSA, 327 (91,34%) geraram padrões de bandas de alta qualidade. Destes, 226 SSRs apresentaram marcas monomórficas, enquanto 101 apresentaram polimorfismo entre os genitores, sendo que, 10 locos apresentaram possível relação entre alto e baixo óleo os quais foram avaliados nos indivíduos dos bulks, indicando que a população de mapeamento obtida por estes genótipos apresenta efetividade para a construção do mapa genético de ligação para o caráter teor de óleo em soja (Figura 5).

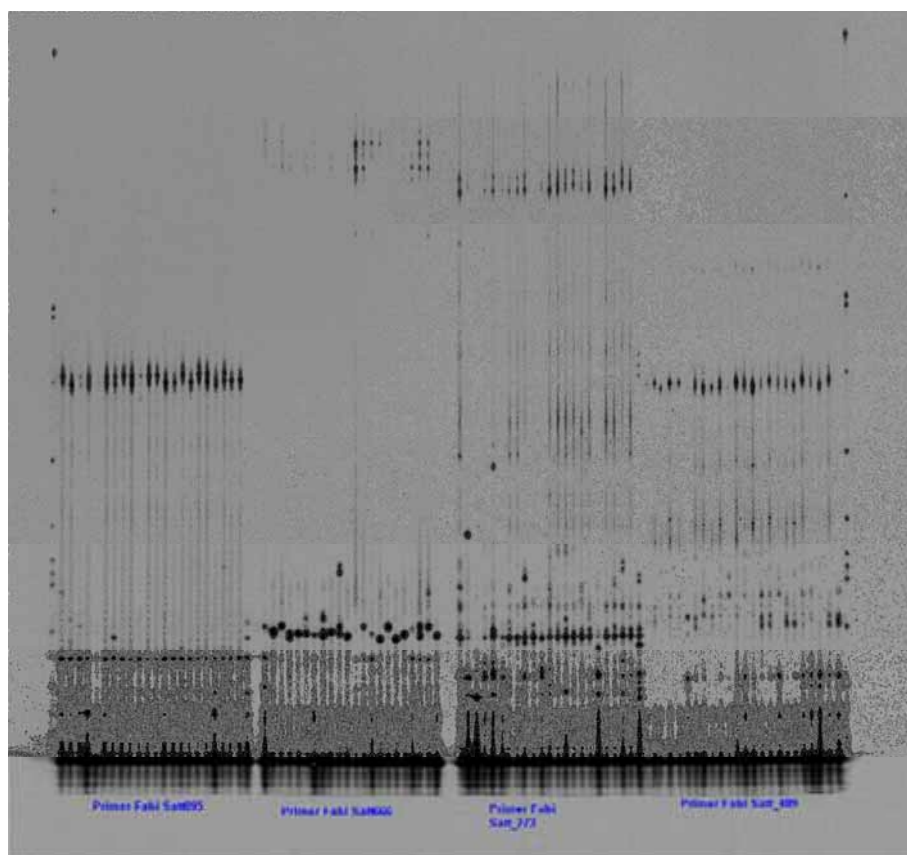


Figura 5: Gel de poliacrilamida de BSA

3.3 Conteúdo de informação polimórfica (PIC)

Dos 101 SSRs polimórficos avaliados nas análises BSA, 62 locos foram utilizados em toda a população de mapeamento por apresentarem bandas de alta qualidade.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,24 até 0,58, com uma média de 0,37 (Tabela 2). Esse valor é similar ao estimado por Vieira et al (2009), que, analisando cultivares de soja, detectaram um valor médio de PIC de 0,40.

Tabela 2: Frequência e valores de conteúdo de informação polimórfica (PIC), para cada um dos alelos de SSRs analisados na caracterização de progênes de soja.

SSR	GL	Bp	Freq alelo 1	Freq alelo 2	PIC
SATT631	N	170 - 173	0,69	0,31	0,33
SATT050	A1	188 - 212	0,29	0,42	0,58
SATT536	M	181- 184	0,44	0,56	0,37
SATT551	M	197 - 209	0,54	0,46	0,37
SATT715	K	250 - 253	0,50	0,50	0,37
SAT_044	K	170 - 176	0,49	0,51	0,37
SATT499	K	311 - 326	0,21	0,79	0,28
SATT500	O	310 - 325	0,52	0,48	0,37
SATT492	O	250 -253	0,53	0,47	0,37
SATT420	O	235 - 247	0,61	0,39	0,36
SATT519	B1	206 - 209	0,46	0,54	0,37
SATT444	B1	184 - 190	0,52	0,48	0,37
SATT353	H	176 - 191	0,43	0,57	0,37
SATT314	H	259 - 262	0,51	0,49	0,37
SATT656	F	170 - 176	0,51	0,49	0,37
SATT601	B2	199 - 202	0,42	0,58	0,37
SATT066	B2	133 - 178	0,54	0,46	0,37
SATT693	J	280 - 295	0,53	0,47	0,37
SCT_065	J	194 - 200	0,31	0,69	0,34
SATT397	D2	178 - 193	0,57	0,43	0,37
SATT076	L	179 - 185	0,43	0,57	0,37
SATT367	I	229 - 238	0,52	0,48	0,37
SATT440	I	212 - 227	0,57	0,24	0,52
AI79	C1	166 - 184	0,76	0,24	0,30
AW310	J	185 - 197	0,57	0,43	0,37
AW734	C2	110 - 137	0,51	0,49	0,37
SATT052	H	248 - 251	0,47	0,53	0,37
SATT132	J	287 - 296	0,51	0,49	0,37
SATT225	A1	123 - 135	0,47	0,53	0,37

SATT256	D2	247 - 256	0,51	0,49	0,37
SATT452	E	230 - 278	0,62	0,38	0,36
SATT537	D1b	152 - 167	0,53	0,47	0,37
SATT543	D2	176 - 191	0,69	0,31	0,34
SATT598	E	176 - 188	0,54	0,46	0,37
SATT629	H	232 - 235	0,52	0,48	0,37
SATT646	C1	209 - 218	0,67	0,33	0,34
SATT675	N	151 - 154	0,79	0,21	0,28
SATT684	A1	178 - 193	0,41	0,59	0,37
SCT_195	N	166 - 169	0,41	0,59	0,37
SATT409	A2	172 - 174	0,52	0,48	0,37
SATT002	D2	142 - 148	0,44	0,56	0,37
SATT095	D1b	171 - 174	0,55	0,45	0,37
SATT102	K	160 - 178	0,32	0,68	0,34
SATT115	G	170- 173	0,51	0,49	0,37
SATT147	D1b	189 - 225	0,61	0,39	0,36
SATT157	D1a	210 - 264	0,83	0,17	0,24
SATT179	D1a	148 - 184	0,52	0,48	0,37
SATT203	D1a	199 - 205	0,46	0,54	0,37
SATT226	D2	326 - 341	0,52	0,48	0,37
SATT233	A2	202 - 211	0,20	0,80	0,27
SATT266	D1b	184 -193	0,61	0,39	0,36
SATT267	D1a	238 - 247	0,75	0,25	0,31
SATT292	I	176 - 179	0,51	0,49	0,37
SATT329	A2	272 - 290	0,51	0,24	0,55
SATT389	D2	235 - 238	0,55	0,45	0,37
SATT429	A2	262 - 286	0,56	0,44	0,37
SATT487	O	220 - 223	0,54	0,46	0,37
SATT530	N	244 - 265	0,24	0,76	0,30
SATT590	M	247 - 256	0,49	0,51	0,37
SATT596	J	268 271	0,63	0,37	0,36
SATT683	N	211 - 214	0,51	0,49	0,37
SCT_188	F	302 - 305	0,76	0,24	0,30
Total		124			
Média					0,37

SSR – Marcador molecular microssatélite, GL – Grupo de ligação, Bp – Pares de base, PIC – Conteúdo de informação polimórfica

3.4 Construção do mapa de ligação e análise de QTLs

Os marcadores SSRs utilizados foram descritos em literatura e seu grupo de ligação (GL) e posição são conhecidos (<http://www.soybase.org>). No total foram utilizados 56 marcadores SSRs distribuídos por 17 grupos de ligação (GL) para a

genotipagem da população F_2 . O programa OneMap (Margarido; Souza; Garcia, 2007) foi utilizado para obtenção do mapa genético. Com base no mapa da soja (Consensus Map 4.0), os grupos de ligação foram analisados separadamente para determinar a posição dos marcadores considerando LOD (*Logarithm of Odds*) de 3.84. A função “order.seq” foi utilizada para determinar qual a melhor ordem dos marcadores dentro de cada grupo de ligação, pois essa função utiliza, automaticamente, as funções “compare” e “try.seq”.

Para o Mapeamento de QTL's foi utilizado o software QTL Cartographer versão 2.5 (Wang; Basten; Zeng, 2005), para análise de mapeamento por intervalo composto (CIM – *Composite Interval Mapping*). Foi utilizado o Modelo 6 do *Zmapqtl* como método de regressão *Forward and Backward Regression*. A presença do QTL foi avaliada a cada 1cM (centiMorgans) considerando uma janela de 10 cM. O LOD mínimo foi determinado considerando um teste de 1000 permutações a 95% de significância.

Foram identificados dois QTL's para a característica avaliada, estando estes localizados no cromossomo 9 (GL K) e cromossomo 12 (GL H), os quais foram significativos para $p < 0,05$ e considerando LOD *threshold* de 3,5 (Figura 6). O QTL identificado no cromossomo 9 (GL K) explica 7,8% da variância fenotípica, enquanto que o QTL do cromossomo 12 (GL H) explica 46,75% desta variância (Tabela 3).

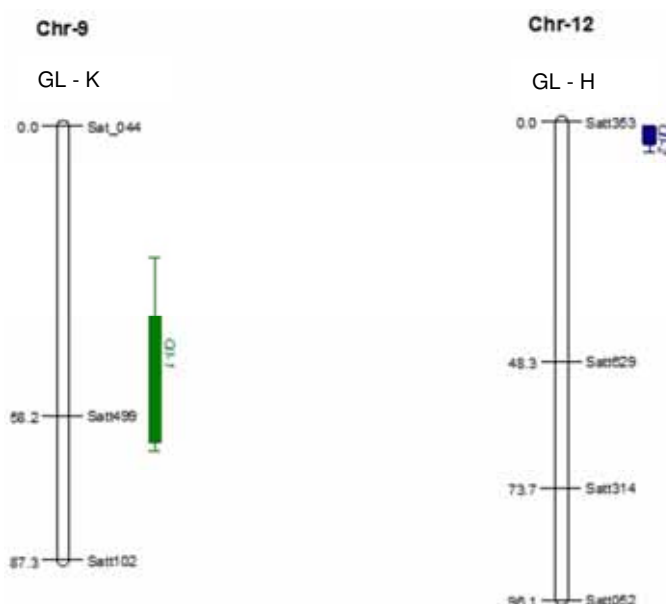


Figura 6: Grupos de ligação definidos em uma população de 244 progênies F_2 de soja, obtidas do cruzamento entre a Linhagem 69 e o cultivar Tucunaré. Foram utilizados como critérios: LOD = 3,84. Os valores da esquerda representam as distâncias entre os marcadores (frequência de recombinação) e, à direita, estão os nomes dos marcadores.

Tabela 3: QTL's para teor de óleo em soja, analisados em 244 progênies oriundas do cruzamento entre a Linhagem 69 e o cultivar Tucunaré.

Chr	GL	Posição (cM)	Marcadores	R ² (%)
Chr-9	K	41 - 55	Sat_044 - Satt499	7,8
Chr-12	H	0 -14 cM	Satt353 - Satt629	46,75
Total				54,55

Chr – Cromossomo, GL – Grupo de ligação, cM – centimorgans, R² – Fração de recombinação

QTL's para o teor de óleo em soja foram encontrados em regiões diferentes ao longo do genoma da soja em diversos estudos. Rodrigues et al. (2010), estudando uma população de 207 progênies provenientes do cruzamento entre a linhagem CS3032PTA276 e a variedade UFS2012, avaliaram 357 pares de locos de SSRs quanto ao nível de polimorfismo nos genitores da população e aproximadamente 100 locos apresentaram fragmentos polimórficos. Destes, 48 marcadores foram amplificados, tendo sido escolhidos por estarem próximos a regiões do genoma da soja em que os QTL's de teor de óleo e proteína foram previamente reportados. Foram gerados nove grupos de ligação cobrindo segmentos genômicos dos grupos A1, B1, D1a, G, I, M e O. Dezesesseis marcadores tiveram associação significativa explicando de 3,1% a 25,4% do valor fenotípico da característica, enquanto que desse total de SSRs, 13 marcadores também apresentaram característica para o teor de proteína que evidencia a probabilidade de que regiões comuns atuem simultaneamente no controle das duas características. Dessa forma, os maiores valores de R², tanto para proteína quanto para óleo, foram verificados para o mesmo marcador, o Satt239 do GL I. Esse estudo indica que essa região apresenta QTL de grande efeito para ambas as características avaliadas.

Pesquisas realizadas por Sebolt et al. (2000); Csanadi et al. (2001); Chung et al. (2003); Reimprecht et al. (2006), também demonstraram regiões genômicas envolvidas no controle de teor de óleo em diferentes populações de soja, validando assim a associação do marcador com a característica no genoma em estudo.

No grupo de ligação A1, no intervalo entre as marcas Satt200 e Satt225 foi detectado um QTL para o teor de óleo que explicou 17,3% da variação da característica, sendo que o marcador Satt236 também mostrou associação com o

conteúdo de óleo explicando 5,2% (RODRIGUES et al., 2010). Outros locos quantitativos com diferentes magnitudes, localidades e populações genéticas foram relatados por Mansur et al. (1996); Brummer et al. (1997) e Specht et al. (2001).

Outro loco associado ao teor de óleo foi detectado no grupo de ligação O, entre os marcadores Satt500 e Satt259 explicando 18,51% da característica, sendo mapeados por Panthee et al. (2005).

O grupo de ligação I tem sido associado ao controle dessa característica por diversos autores. Chung et al. (2003) mapearam QTLs que explicaram 27,8% e 24,2% da variação do teor de óleo no ano de 1996 e 1999 respectivamente. Estudos realizados por Nichols et al. (2006) estudaram dois grupos de populações de retrocruzamento e verificaram que o QTL principal que controla a variação no teor de óleo no grupo I encontra-se a 3cM, entre o microssatélite Satt239 e o AFLP ACG9b.

Tajuddin et al. (2003) utilizaram 157 RILs e mapearam QTLs que explicaram, em dois anos, 8,6% da variação do teor de óleo na região do Satt239.

Locos associados para o teor de óleo na região no Satt239 no grupo de ligação I foram relatados por diversos autores em ambientes e backgrounds genéticos diferentes, o que indica a presença de genes conservados na região, validando assim a presença dessa marca no genoma da espécie em estudo com grande relevância no mapeamento genético do conteúdo de óleo, no sentido de se determinar com precisão a localização do QTL. Além, disso, esses mesmos intervalos afetam também o conteúdo de proteína revelando efeitos pleiotrópicos de um ou mais genes presentes na região.

Comparando o mapa aqui obtido com outros mapas derivados de cruzamentos bi-parentais envolvendo linhagens elites e cultivares, fica evidente que o mapa do cruzamento Linhagem 69 X Tucunaré é parcial, sendo necessária a inclusão de novos marcadores. A população oriunda do cruzamento bi-parental entre a linhagem 69 e o cultivar Tucunaré indica a presença de variabilidade suficiente tanto para o caráter teor de óleo quanto em relação ao polimorfismo ao nível dos marcadores moleculares. Sendo assim, tais informações permitem que a população seja explorada para a detecção e mapeamento de QTL's envolvidos com o caráter acima mencionado.

4 CONCLUSÃO

Foi possível identificar QTLs de efeito maior e menor para o teor de óleo, na população utilizada para mapeamento.

Novos QTLs foram mapeados no grupo de ligação K, sendo considerado de menor efeito (Sat_044 – Satt499) e de efeito maior no grupo de ligação H (Satt353 – Satt629).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLIPRANDINI, L.F.; ABATTI, C.; BERTAGNOLLI, P.F.; CAVASSIM, J.E.; GABE, H.L.; KUREK, A.; MATSUMOTO, M.N.; OLIVEIRA, A.R.; PITOL, C.; PRADO, L.C.; STECKLING, C. Understanding soybean maturity groups in Brazil: environment, cultivar classification, and stability. **Crop Science**, v.49, p.801-808, 2009.

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

BRUMMER, E.C.; GRAEF, G.L.; ORF, J.; WILCOX, J.R.; SHOEMAKER, R.C. Mapping QTL for seed protein and oil content in eight soybean populations. **Crop Science**, Madison, v.37, p.370-378, 1997.

CATO, S. A.; GARDNER, R. C.; KENT, J.; RICHARDSON, T. E. A rapid PCR – method for genetically mapping ESTs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, p. 296-306, 2001.

CHUNG, J.; BABKA, H.L.; GRAEF, G.L.; STASWICK, P.E.; LEE, D.J. CREGAN, P.B; SHOEMAKER, R.C.; SPEECH, J.E. The seed protein, oil, and yield QTL on soybean linkage group I. **Crop Science**, Madison, v.43, p.1053-1067, 2003.

CSANÁDI G.; VOLLMANN, J.; STIFT, G.; LELLEY, T. Seed quality QTLs identified in a molecular map of early maturing soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.103, p.912-919, 2001.

FEHR, W.R.; CAVINESS, J.A. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 11p. (Special Report, 80).

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

JARNE, P., LAGODA, P.J.L. Mcrossatellites, from molecules to populations and back. **TREE**, Washington, v. 11, n. 10, p. 424-429, 1996.

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

MARGARIDO, G.R.; SOUZA, A.P.; GARCIA, A.A. OneMap: software for genetic mapping in out crossing species. **Hereditas**, Lund, v.144, n.3, p.78-79, 2007.2007.

NICHOLS, D.M.; GLOVER, K.D.; CARLSON, S.R.; SPECHT, J.E.; DIERS, B.W. Fine mapping of a seed protein QTL on soybean linkage group I and its correlated effects on agronomic traits. **Crop Science**, Madison, v.46, p.834-839, 2006.

PANTHEE, D.R.; PANTALONE, V.R.; WEST, D.R.; SAXTON, A.M.; SAMS, C.E. Quantitative trait loci for seed protein and oil concentration and seed size in soybean. **Crop Science**, Madison, v.45, p.2015-2022, 2005.

POWELL, W.; MACHRAY, G.; PROVAN, J. Polymorfism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 1, n. 7, p. 215-221, 1996)

REINPRECHT, Y.; POYSA, V.W.; YU, K.; RAJCAN, I.; ABLETT, G.R.; PAULS, K.P. Seed and agronomic QTL in low linolenic acid, lipoxygenase free soybean germoplasm. **Genome**, Otawwa, v.49, p.1510-1527, 2006.

RODRIGUES, J. I.da S.; MIRANDA, F. D.; FERREIRA, A.; BORGES, L. L.; FERREIRA, M. F. da S.; GOOD-GOD, P. I. V.; PIOVESAN, N. D.; BARROS, E. G.; CRUZ, C. D.; MOREIRA, M. A. Mapeamento de QTL para conteúdos de proteína e óleo em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.5, p.472-480, 2010.

SEBOLT, A.M.; SHOEMAKER, R.C.; DIERS, B.W. Analysis of a quantitative trait locus allele from wild soybean that increases seed protein concentration in soybean. **Crop Science**, Madison, v.40, p.1438-1444, 2000.

SPECHT, J.E.; CHASE, K.; MACRANDER, M.; GRAEF, B.L.; CHUNG, J.; MARKWELL, J.P.; GERMANN, M.; ORF, J.H.; LARK, K.G. Soybean response to water: a QTL analysis of drought tolerance. **Crop Science**, Madison, v.41, p.493-509, 2001.

TAJUDDIN, T.; WATANABE, S.; YAMANAKA, N.; HARADA, K. Analysis of quantitative trait loci for protein and lipid contents in soybean seeds using recombinant inbred lines. **Breeding Science**, Tokyo, v.53, p.133-140, 2003.

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

WANG S.; BASTEN C.J.; ZENG Z.B. **Windows QTL cartographer 2.5**. Raleigh: North Carolina State University, 2005.

ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, Pittsburgh, v.136, n.9, p.1457-1468, 1994.