

VINÍCIUS DE ANDRADE

**MARCADORES MORFOLÓGICOS E MOLECULARES NA
IDENTIFICAÇÃO E DISTINÇÃO DE *OFF-TYPE* EM CAMPOS DE
PRODUÇÃO DE SEMENTES DE SOJA**



Universidade Federal de Uberlândia
2012

VINICIUS DE ANDRADE

**MARCADORES MORFOLÓGICOS E MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO E
DISTINÇÃO DE *OFF-TYPE* EM CAMPOS DE PRODUÇÃO DE SEMENTES DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Agronomia, área de
concentração Fitotecnia, para obtenção do título de
Mestre.

Orientador
Prof. Dr. Osvaldo Toshiyuki Hamawaki

Co-orientador
Dr. Anderson Rotter Meda

UBERLÂNDIA-MG
2012

**MARCADORES MORFOLÓGICOS E MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO E
DISTINÇÃO DE *OFF-TYPE* EM CAMPOS DE PRODUÇÃO DE SEMENTES DE SOJA**

Vinícius de Andrade

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração
Fitotecnia, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de março de 2012.

Dra. Ana Paula Oliveira Nogueira UFU

Dr. Carlos Machado dos Santos UFU

Dra. Flávia Aparecida Amorim NATURALLE

Prof. Dr. Osvaldo Toshiyuki Hamawaki
ICIAG - UFU
(Orientador)

Dr. Anderson Rotter Meda
SYNGENTA
(Co-orientador)

UBERLÂNDIA-MG
2012

A DEUS, por sempre ter aberto todas as portas.

A minha esposa Renata, pelo amor, pelo carinho, pela dedicação, pelo companheirismo, e, principalmente, pela paciência.

As minhas irmãs Thaís e Vanessa, pelo amor, pela amizade e pelo carinho.

Aos meus avós, Pedro e Hosana (In memoriam), pelo exemplo de importância da união familiar.

OFEREÇO.

Aos meus pais, Cida e Afonso, pelo amor incondicional, pelos limites impostos nos momentos certos e por sempre acreditarem na minha capacidade.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU), via Instituto de Ciências Agrárias, pela oportunidade de realização do Curso.

Ao Professor Osvaldo Toshiyuki Hamawaki, pela orientação, pela troca de experiências e pela paciência na condução das atividades.

À Professora Denise Garcia de Santana, pela amizade, pelo suporte nas análises estatísticas e pelo exemplo de comprometimento e de seriedade.

À Professora Édila V. R. Von Pinho, por fazer-me apaixonar pela pesquisa e pelo melhoramento genético de plantas, por meio de seu exemplo de dedicação.

À Syngenta, por proporcionar o tempo necessário para a conciliação desse trabalho com as atividades profissionais. Valeu a pena.

Ao colega Maximilian Gomes (*In memoriam*), pelo exemplo de vida, de hombridade, de amizade e por me abrir as portas da Syngenta. Você faz muita falta aqui.

Ao colega Ademir Capelaro, pela amizade, pelos ensinamentos e pelo suporte no desenvolvimento profissional.

Aos colegas Andreomar Kurek e José Flávio Silva, por serem os primeiros a acreditarem que todo este esforço seria válido.

Aos parceiros de todas as horas, Ivandro Bertan e Anderson Meda, por serem minha família em Uberlândia, por proporcionarem momentos de aprendizado técnico e por compartilharem momentos de alegria e de descontração.

Ao nosso time de LPM Syngenta Brasil, Bruno Carvalho, Agenor Melo, Plínio Lima e demais colegas, pela amizade, pelo companheirismo e por “segurarem as pontas” em todos os momentos.

Aos meus padrinhos Osvaldo e Lurdinha, pelo carinho incondicional e por torcerem de coração pelas minhas vitórias.

Aos colegas Rudimar Mafacioli, Fabrício Giolo, Márcio Freitas, Daniel Rosa, Rafael Ribeiro, Julio Fatoretto, Jair Duarte, Gustavo Biudes, Lisandro Rambo, Irineu Hartwig, Vitor Hugo Barbieri, Pedro Belicuas, Márcio Candiottto e demais colegas da Syngenta, pelos momentos de companheirismo.

A todos os que, de alguma forma, contribuíram para que essa vitória fosse alcançada.

RESUMO

ANDRADE, Vinícius de. **Marcadores morfológicos e moleculares na identificação e distinção de *off-type* em campos de produção de sementes de soja.** 2012. 63 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.¹

Os marcadores morfológicos são ferramentas úteis no processo de identificação de *off-type* (plantas atípicas) em campos de produção de sementes, mas fatores ambientais podem gerar alteração no fenótipo de determinados indivíduos, sendo os marcadores moleculares ferramentas úteis no processo de validação da real diferença genotípica entre esses indivíduos e a cultivar em estudo. Objetivou-se nesse trabalho avaliar a eficiência do uso de marcadores moleculares SNP's na discriminação de *off-type* genotípicos e fenotípicos (falso positivos) em campos de produção de sementes de soja. Foram utilizadas dez linhagens desenvolvidas pelos programas de melhoramento genético da Syngenta Seeds Ltda., situados em Cascavel-PR, Uberlândia-MG e Lucas do Rio Verde-MT. Cada linhagem foi semeada em seu ambiente de adaptação na safra de verão do ano 2009/10. Foram então coletados dados de 22 características morfológicas para cada linhagem. Após devidamente descrita cada linhagem, na safra de inverno do ano 2010 foram implantados campos de multiplicação das dez linhagens, na cidade de Planura-MG. Nos estádios fenológicos R6 e R7 foram coletadas as plantas fenotipicamente avaliadas como atípicas para cada linhagem, para qual foram consideradas características de controle genético complexo. As plantas foram encaminhadas para o Laboratório de Genética Molecular da Syngenta, em Uberlândia-MG, onde suas sementes foram germinadas e o DNA das plântulas analisado com o uso de marcadores moleculares SNP. Foram utilizados 20 SNP assays, sendo que cada marcador representou um cromossomo da soja, visando cobrir todo o genoma. Entre as plantas consideradas *off-type* fenotípicos por meio da análise visual dos descritores morfológicos, apenas 27,64% foram confirmados pela ferramenta molecular como geneticamente distintos da população padrão, com um intervalo de confiança entre 19,7% e 35,5%. O uso de ferramentas moleculares é útil no processo de distinção de *off-type* genotípicos e fenotípicos (falso positivos) devido a fatores ambientais, evitando o descarte de lotes de sementes com alto padrão genético.

Palavras-chave: *Glycine max* (L.). Pureza genética. Marcadores genéticos. SNP. Off-type.

¹ Comitê orientador: Prof. Dr. Osvaldo Toshiyuki Hamawaki - UFU (Orientador) e Dr. Anderson Rotter Meda – SYNGENTA (Co-orientador).

ABSTRACT

ANDRADE, Vinícius de. **Morphological and molecular markers in *off-type* identification and distinction in soybean seeds fields production.** 2012. 63 p. (Master Science in Agronomy) – Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG².

Morphological markers are useful tools for identifying *off-type* (atypical plants) in seed production fields. However, environmental factors can cause changes in certain individuals' phenotype, turning molecular markers into useful tools for verification of possible genotypic differences between these individuals and the variety studied. The aim of this study was to evaluate the efficiency of SNP markers in identifying *off-type* based on genotypic and phenotypic (false positive) discrimination in soybean field production. Ten lines developed by Syngenta Breeding Program located in Cascavel-PR, Uberlândia-MG and Lucas do Rio Verde-MT were used. Each line was planted in its adaptation environment in the summer season / 2009-10. Data was collected from 22 morphological features for each line. After properly describing each line, field increases of these ten lines were carried out in Planura-MG, in the winter season / 2010. In the growth stages R6 and R7 the plants phenotypically atypical for each line were collected and evaluated, to which were considered only characteristics controlled by complex genetics. The DNA of the collected plants was analyzed using SNP markers. Twenty SNP assays were used, where each marker represented one soybean chromosome in order to cover the entire genome. Among the plants considered phenotypic *off-type* using visual morphological traits' analyses, only 27.64% were confirmed by molecular tool as genetically distinct from the standard population, with a confidence interval between 19.7% and 35.5%. The use of molecular tools is effective for the discrimination of *off-type* genotypic and phenotypic (false positive) process due to environmental factors, preventing the write-off of seed lots that may meet the high genetic standards.

Keywords: *Glycine max* (L.). Genetic purity. Genetic markers. SNP. *Off-type* .

² Guidance Committee: Dr. Osvaldo Toshiyuki Hamawaki - UFU (Major Professor) and Dr. Anderson Rotter Meda – SYNGENTA.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
1.1 A cultura da soja.....	16
1.1.1 Origem e taxonomia.....	16
1.1.2 Importância econômica.....	16
1.2 Padrões e processos para produção de sementes de soja no Brasil.....	17
1.2.1 Regulamentação da produção de sementes de soja no Brasil.....	17
1.2.2 Categorias e padrões para produção de sementes de soja no Brasil.....	18
1.2.3 Estádios fenológicos e sua importância na inspeção de campos de produção de sementes.....	19
1.2.4 Componentes morfológicos utilizados na caracterização de cultivares.....	20
1.2.4.1 Caule e tipo de crescimento.....	23
1.2.4.2 Folhas.....	23
1.2.4.3 Pubescência.....	23
1.2.4.4 Hipocótilo.....	24
1.2.4.5 Flores.....	24
1.2.4.6 Legume.....	25
1.2.4.7 Semente.....	26
1.2.5 Interação genótipo x ambiente e sua influência na produção de sementes.....	27
1.2.6 Melhoramento genético e desenvolvimento de cultivares.....	28
1.3 Marcadores moleculares em espécies vegetais.....	30
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.1 Etapa I: Fenotipagem para caracteres morfológicos.....	32
2.2 Etapa II: Detecção dos <i>off-type</i> fenotípicos.....	34
2.3 Etapa III: Validação genotípica.....	35
2.4 Análises estatísticas.....	35
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Esquema das categorias de sementes de soja no Brasil	19
FIGURA 2 Planta com tipo de crescimento determinado	22
FIGURA 3 Planta com tipo de crescimento indeterminado	22
FIGURA 4 Planta com tipo de crescimento semideterminado.....	23
FIGURA 5 Trifólio de folhas ovaladas (A) e trifólio de folhas lanceoladas (B) de soja	23
FIGURA 6 Pubescência marrom (A) e pubescência cinza (B) em plantas de soja.....	24
FIGURA 7 Detalhe de plântula de soja com hipocótilo verde (A) e hipocótilo roxo (B).....	24
FIGURA 8 Flor branca (A) e flor roxa (B) em soja.	25
FIGURA 9 Pigmentação por antocianina em legumes de plantas de soja.	25
FIGURA 10 Detalhe de hilo em sementes de soja. Hilo de coloração marrom clara (A) e hilo de coloração preta (B).	26
FIGURA 11 Brilho de tegumento em sementes de soja.....	26
FIGURA 12 Análise de peroxidase em soja com resultados de reação positiva (A) e reação de negativa (B).....	27
FIGURA 13 Esquema dos métodos de condução de populações segregantes de espécies autógamas. À direita, método genealógico ou <i>pedigree</i> ; à esquerda, método massal ou <i>bulk</i>	30
FIGURA 14 Plantas com fenótipo padrão (A) e plantas com fenótipo <i>off-type</i> (B) para a Linhagem 1.	48
FIGURA 15 Tonalidade de vagem e pubescência (A) e coloração de hilo (B) de planta fenótipo padrão e planta fenótipo <i>off-type</i> da Linhagem 1	48
FIGURA 16 Plantas com fenótipo padrão (A) e plantas com fenótipo <i>off-type</i> (B) para a linhagem L2.	49
FIGURA 17 Coloração de tegumento (A) e tonalidade de vagem e pubescência (B) de planta fenótipo padrão e planta fenótipo <i>off-type</i> da Linhagem 2.	49
FIGURA 18 Detalhe de vagem da planta padrão (A) e detalhe da vagem do tipo de planta <i>off-type</i> (B) para a Linhagem 2.	50
FIGURA 19 Plantas com perfil fenotípico padrão para a Linhagem 3.	51

FIGURA 20 Comparação entre planta com fenótipo atípico (A) e planta com fenótipo padrão para a Linhagem 3.....	51
FIGURA 21 Comparação entre as plantas com perfil fenotípico padrão (A) e plantas com fenótipo <i>off-type</i> (B) para a Linhagem 6.....	51
FIGURA 22 Planta com perfil fenotípico padrão (A) e planta <i>off-type</i> (B) para a Linhagem 5.	52
FIGURA 23 Plantas com perfil fenotípico padrão (A) para a Linhagem 9 e plantas caracterizadas como fenotipicamente fora de tipo para os caracteres descritos para a linhagem.....	54
FIGURA 24 Diferentes fenótipos encontrados no campo de produção da Linhagem 7. Plantas com perfil fenotípico padrão (A), plantas com fenótipo atípico mais precoce (B) e plantas com fenótipo atípico mais tardio (C).	54
FIGURA 25 Vagens oriundas de uma mesma planta atípica de ciclo mais precoce dentro da Linhagem 7, com sementes em diferentes estádios de enchimento de grãos.	55
FIGURA 26 Presença de microescleródios do fungo <i>Macrophomina phaseolina</i> em plantas atípicas de ciclo mais curto da Linhagem 7.....	55
FIGURA 27 Variações na coloração do hilo, tegumento e formato de sementes oriundas de uma mesma planta atípica da Linhagem 7, morta precocemente pelo fungo <i>Macrophomina phaseolina</i> , causador da podridão preta da raiz.	57
FIGURA 28 Soja com diferentes tonalidades de pubescência dentro da mesma planta (A); terço superior da planta com pubescência marrom clara/cinza (B); terço médio da planta com pubescência marrom intermediária (C); terço inferior da planta, com pubescência marrom escura (D); e vagens dos diferentes terços da planta, com diferentes tonalidades de pubescência (E).	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Padrões para produção e comercialização de sementes de soja	18
TABELA 2 Estádios fenológicos da cultura da soja	20
TABELA 3 Controle genético da cor de flor em soja	21
TABELA 4 Geração de endogamia, frequência esperada de indivíduos heterozigotos e homozigotos e número esperado de indivíduos heterozigotos e homozigotos recessivos, por hectare.	29
TABELA 5 Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill	32
TABELA 6 Caracterização fenotípica de linhagens de soja utilizando-se 22 descritores morfológicos, na safra de verão 2009, para os caracteres recomendados pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares, nos municípios de Cascavel-PR, Uberlândia-MG e Lucas do Rio Verde-MT.....	37
TABELA 7 Altura de planta, número de dias para florescimento (R1) e número de dias para maturação (R8) no ciclo de inverno para a soja, no município de Planura-MG.....	38
TABELA 8 Número de <i>off-type</i> fenotípicos encontrados no campo de produção, na geração de inverno do ano de 2010, no município de Planura-MG.....	38
TABELA 9 Resultados das análises genotípicas via marcadores moleculares SNP, utilizando-se 20 SNP assays, para a distinção entre <i>off-type</i> fenotípicos e <i>off-type</i> genotípicos, em soja.	40
TABELA 10 Número de <i>off-type</i> fenotípicos, número de <i>off-type</i> genotípicos e número de falso positivos por meio da análise dos dados via estatística não-paramétrica, pelo cálculo do intervalo de confiança, ao nível de 95%.....	47
TABELA 11 Simulação da frequência esperada de indivíduos genotipicamente distintos em diferentes populações de <i>off-type</i> fenotípicos.....	47
TABELA 12 Número de plantas fenotipicamente distintas, número de plantas genotipicamente distintas, plantas genotipicamente idênticas ao padrão e percentual de erro da análise fenotípica para a Linhagem 1, coletada em Planura-MG.	49

TABELA 13	Número de plantas fenotipicamente distintas, número de plantas genotipicamente distintas, plantas genotipicamente idênticas ao padrão e percentual de erro da análise fenotípica para a Linhagem 2, coletada em Planura-MG	50
TABELA 14	Número de plantas fenotipicamente distintas, número de plantas genotipicamente distintas, plantas genotipicamente idênticas ao padrão e percentual de erro da análise fenotípica para as linhagem L3, L4 e L6, coletadas em Planura-MG.....	52
TABELA 15	Número de plantas fenotipicamente distintas, número de plantas genotipicamente distintas, plantas genotipicamente idênticas ao padrão e percentual de erro da análise fenotípica para a Linhagem 5, coletada em Planura-MG	52
TABELA 16	Número de plantas fenotipicamente distintas, número de plantas genotipicamente distintas, plantas genotipicamente idênticas ao padrão e percentual de erro da análise fenotípica para as linhagem L8, L9 e L10, coletadas em Planura-MG.....	53
TABELA 17	Número de plantas fenotipicamente distintas, número de plantas genotipicamente distintas, plantas genotipicamente idênticas ao padrão e percentual de erro da análise fenotípica para a Linhagem 7, coletada em Planura-MG.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DHE	Distinguibilidade, Homogeneidade, Estabilidade
DNA	<i>DeoxyriboNucleic Acid</i> - ácido desoxirribonucleico
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - reação da polimerase em cadeia
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i> - loci para característica quantitativa
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> - análise de restrição de fragmentos polimórficos
RNC	Registro Nacional de Cultivares
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNPC	Serviço Nacional de Proteção de Cultivares
SNSM/MAPA	Sistema Nacional de Sementes e Mudas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
VCU	Valor de Cultivo e Uso

INTRODUÇÃO

A soja é a cultura de maior importância para a balança comercial nacional em exportação de *commodities*. É a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas e corresponde a 48,6% da área plantada em grãos do País, que na safra atual foi de 50.660.000 de hectares. Na safra 2011/12, o Brasil atingiu 24.630.000 hectares plantados com a cultura, mantendo-se na posição de segundo maior produtor de soja do mundo. A produção nacional estimada do grão para a safra 2011/12 é de 71.750.000 toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2012).

Com a intensificação da agricultura, cresce proporcionalmente a busca dos agricultores por insumos agrícolas mais eficientes, visando ao uso racional dos recursos disponíveis e objetivando maior produção por unidade de área. Nesse contexto, aplica-se o conceito do melhoramento genético de plantas, visando à criação de novas cultivares mais adaptadas e eficientes no uso dos recursos disponíveis. O melhoramento genético de plantas compreende a seleção de diferentes genótipos, a partir da combinação e da incorporação de características agronômicas de interesse em várias linhagens. Sendo a soja uma espécie melhorada de base genética considerada estreita, seus caracteres morfológicos pouco se distinguem entre as cultivares comercialmente disponíveis, sendo pequena a possibilidade de variabilidade fenotípica nas combinações utilizadas em programas de melhoramento genético, resultando em novas cultivares fenotipicamente semelhantes às já existentes no mercado.

O veículo utilizado para levar até o campo a tecnologia incorporada à cultivar por meio do melhoramento genético de plantas é a semente. Ela é responsável pela transferência de inovações tecnológicas e dos ganhos genéticos resultantes dos trabalhos de melhoramento, seja ele clássico ou resultado da Engenharia Genética. A qualidade da semente, definida como sendo o somatório de todos os atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários, é um dos principais fatores na determinação do sucesso de uma cultura (VIEIRA, 1980).

Para que todos os esforços realizados na obtenção de uma variedade melhorada sejam traduzidos em benefícios para a produção agrícola, é necessário que as sementes utilizadas pelos produtores tenham alta qualidade e, portanto, alto padrão de qualidade genética se espera das empresas obtentoras de cultivares; em que a certificação de sementes é fundamental como agente controlador. Entre os aspectos observados durante a certificação de sementes de soja, talvez o de mais difícil determinação seja a pureza genética varietal, atualmente realizada com o auxílio de descritores morfológicos associados às plantas, tais como pigmentação do hipocótilo, cor de flor, cor de pubescência, tipo de crescimento, grupo de maturidade relativa, tipo de folha e sementes, sendo intrínsecos à cultivar seu tamanho médio, formato, coloração e aspecto do tegumento, cor e formato do hilo.

Para a produção de sementes dentro das categorias Semente Básica, Semente Certificada e Semente Fiscalizada, as companhias detentoras de cultivares realizam junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) registro dos campos onde as sementes das cultivares são produzidas. Esses campos são fiscalizados por parte de oficiais do MAPA e de outros órgãos fiscalizadores credenciados para tal, com o intuito de averiguarem a veracidade dos dados transmitidos ao Governo no tocante informações referentes à cultivar (BRASIL, 2005).

As características fenotípicas da planta são descritores usuais para a caracterização de cultivares. Dessa forma, os dados que são utilizados para registro de cultivares atualmente no Brasil são características morfológicas das plantas e características morfológicas das sementes que correspondem a determinada cultivar. Como a cultura da soja é passível de interação do genótipo com o ambiente, em determinadas situações de condições adversas ou de fatores bióticos/abióticos não controláveis, a lavoura e/ou plantas individualmente podem interagir com esses fatores e expressarem fenótipos diferentes, que não necessariamente correspondem a genótipos diferentes (ALLARD, 1971).

O controle genético de diversas características morfológicas da soja é relativamente simples. Características como cor de flor, cor de pubescência, cor de hipocótilo, entre outras características morfológicas de herança monogênica, permitem sua utilização na avaliação da qualidade genética de campos de sementes com segurança, pois não sofrem influência do ambiente. No entanto, o número de caracteres morfológicos disponíveis para caracterização, distinção de cultivares e, principalmente, para determinação de contaminantes dentro de campos de produção é limitado. Esses contaminantes são denominados nos meios de produção de sementes como *off-type*.

Segundo Allard (1971), alguns caracteres morfológicos de controle oligogênico ou poligênico podem sofrer forte influência ambiental. O uso de características como ciclo das plantas como parâmetro para definição de plantas *off-type* dentro de campos de produção pode facilmente induzir ao erro, uma vez que tal característica pode ser facilmente influenciável por pragas, doenças, fertilidade do solo, entre outras.

Em virtude desse limitado número de caracteres morfológicos disponíveis e da influência ambiental em características de origem genética mais complexa, faz-se necessário o uso de ferramentas complementares como forma de maximizar a confiança na tomada de decisão sobre o que considerar realmente como distinto do padrão da cultivar e o que não considerar. Dentro desse contexto, os marcadores moleculares aparecem como uma excelente ferramenta. A avaliação da pureza genética de plantas com base em marcadores moleculares de DNA é conclusiva, uma vez que eles não sofrem influência ambiental e os dados obtidos são reprodutíveis e estáveis (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do uso de marcadores moleculares na discriminação de *off-type* genotípicos e fenotípicos (falso positivos) em campos de produção de sementes de soja.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 A cultura da soja

1.1.1 Origem e taxonomia

A soja é uma planta autógama e anual, pertence à família *Fabaceae*, subfamília *Papilionoideae*, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Phaseolinae* (*Glyciniae*), gênero *Glycine* L., subgênero *soja* (Moench) F. J. Germ. e à espécie *Glycine max* (L.) Merrill. A palavra soja teve origem do japonês *shoyu* e a descrição de sua origem está contida no livro *Pen Ts' ao Kong Um*, no qual o Imperador Sheng-Nung, aproximadamente no ano 2.838 a.C., descreve as plantas da China. (SEDIYAMA *et al.*, 2009).

A espécie de soja cultivada atualmente foi descrita por Linnaeus em 1753 como *Phaseolus max* (baseado em plantas que ele mesmo viu) e por *Dolichos soja* (baseado em outros autores); após diversas alterações, foi aceita a proposta de Merril, em 1917, desde então o nome da espécie passou a ser *Glycine max* (L.) Merrill (HYMOWITZ *et al.*, 1983).

A primeira referência sobre soja no Brasil data de 1882, na Bahia. No entanto, as cultivares introduzidas dos Estados Unidos da América do Norte não tiveram boa adaptação numa latitude em torno de 12 graus Sul. Mais tarde, em 1891, novas cultivares foram introduzidas em Campinas, São Paulo, em latitude em torno de 22 graus Sul. Nessa região, a soja apresentou melhor desenvolvimento do que na Bahia. Nesse mesmo ano, foi também introduzida no Rio Grande do Sul. Em 1908, com a vinda de imigrantes japoneses para São Paulo, foram introduzidas novas cultivares, mais especificamente para consumo humano. Em Santa Catarina, foi introduzida na década de 1930, em Minas Gerais na década de 1920, no município de Lavras e, em Goiás, a introdução ocorreu em 1950. Nos demais estados da região Centro-Norte-Nordeste, a introdução ocorreu principalmente a partir da década de 1970 (MIYASAKA; MEDINA, 1981).

1.1.2 Importância econômica

A soja é uma das culturas mais importantes do mundo. Seu grão é rico em proteína, em torno de 40%, e óleo em torno de 20%. A planta pode ser utilizada como adubo verde, forragem, silagem, feno e pastagem. O grão pode fornecer o óleo para a alimentação humana, para a produção de biodiesel, de desinfetantes, de lubrificantes, de sabões, entre outros fins. O farelo é utilizado na alimentação humana e animal e, também, na manufatura de produtos processados e semiprocessados.

No Brasil, a soja viabilizou a implantação de indústrias de óleo, fomentou o mercado de sementes e deu estabilidade à exploração econômica das terras onde antes só existiam matas e cerrados (ORNELLAS, 2000).

O grão da soja dá origem a produtos e a subprodutos utilizados atualmente pela agroindústria de alimentos e pela indústria química. A proteína de soja dá origem a produtos comestíveis como ingredientes de padaria, massas, produtos de carne, cereais, misturas preparadas, bebidas, alimentação para bebês, confeções e alimentos dietéticos. O grão é utilizado também pelas indústrias de adesivos, de nutrientes, de alimentação animal, de adubos, de formulador de espumas, na fabricação de fibra, de revestimento, de papel e na emulsão de água para tintas. A soja integral é utilizada pela indústria de alimentos em geral e o óleo cru se transforma em óleo refinado e lecitina, que dá origem a inúmeros outros produtos (CONWAY, 2003).

Na safra 2011/12, a cultura da soja teve uma das maiores áreas plantadas na História, quando se consideram os dois principais países produtores, com os Estados Unidos da América atingindo 75,208 milhões de acres ou 30,436 milhões de hectares (USDA, 2011), e o Brasil, com 24,630 milhões de hectares de área plantada, conforme citado anteriormente (CONAB, 2012).

1.2 Padrões e processos para produção de sementes de soja no Brasil

1.2.1 Regulamentação da produção de sementes de soja no Brasil

O Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) é o órgão nacional responsável pela divulgação dos descritores mínimos utilizados como parâmetros para a descrição de cultivares de soja. A elaboração desses descritores envolve a formação de grupos técnicos de conhecimento aprofundado na cultura. A caracterização de forma precisa da cultivar é um dos pontos essenciais para garantir o direito de propriedade intelectual, instituído pela Lei de Proteção de Cultivares (BRASIL, 2009).

Para que possa ser produzida e comercializada uma nova variedade no território brasileiro, é necessário que previamente seja feito seu registro junto ao MAPA. O Registro Nacional de Cultivares (RNC) é o órgão do Governo Federal responsável por habilitar previamente cultivares e espécies para a produção e para a comercialização de sementes e de mudas no País. As normas do SNPC para a inscrição de cultivares de soja no Registro Nacional de Cultivares preveem a realização de ensaios de VCU – Valor de Cultivo e Uso – em, pelo menos, um local por região edafoclimática, durante dois anos (KASTER, 2002).

Os ensaios de VCU devem obedecer aos critérios estabelecidos pelo MAPA e contemplar o planejamento e desenho estatístico que permitam a observação, a mensuração e a análise dos diferentes caracteres das distintas cultivares, assim como a avaliação do seu comportamento e da sua qualidade.

As cultivares que forem submetidas ao RNC devem obedecer aos critérios de DHE – Distinguiabilidade, Homogeneidade e Estabilidade. O critério de distinguibilidade tem como requisito que a nova cultivar tenha características morfológicas que permitam sua distinção com relação às cultivares já registradas no País. O critério da homogeneidade pressupõe que a variedade seja uniforme para os caracteres avaliados. Já o critério de estabilidade tem como pressuposto que as características avaliadas sejam herdáveis e estáveis e não sofram influência ambiental (BRASIL, 2009).

1.2.2 Categorias e padrões para produção de sementes de soja no Brasil

A produção de sementes de soja, no Brasil, é regulamentada pelo Sistema Nacional de Sementes e Mudas – SNSM/MAPA. Toda a produção deve partir de uma classe inicial, geneticamente íntegra e com padrão de mistura varietal zero. Essa classe, denominada Semente Genética, é de total responsabilidade do obtentor vegetal (KRZYZANOWSKI, 1993).

A partir da Semente Genética é que se dão origem as demais categorias. A categoria denominada Semente Básica é resultante da multiplicação da Semente Genética ou da própria categoria. Os órgãos responsáveis regulamentam que o padrão de mistura varietal dentro dessa categoria é de 1/2000 (TABELA 1), ou seja, uma planta *off-type* em 2000 plantas. Deve ser produzida em campo específico, cujo plantio deve ser informado ao Ministério da Agricultura. A categoria Semente Básica tem por intuito manter a identidade e pureza genética da cultivar.

As inspeções realizadas pelos órgãos competentes visam à manutenção da identidade genética da cultivar e à garantia de que a semente que chegará ao mercado corresponde à cultivar registrada no RNC, assegurando ao consumidor final que todo seu potencial genético será expresso.

TABELA 1 Padrões para produção e comercialização de sementes de soja no Brasil

1. Espécie	SOJA			
Nome científico	<i>Glycine max L.</i>			
2. Peso máximo do lote (kg):	25.000			
3. Peso mínimo das amostras (g):				
- Amostra submetida ou média	1.000			
- Amostra de trabalho para análise de pureza	500			
- Amostra de trabalho para determinação de outras sementes por número	1.000			
4. Padrão				
	Parâmetros	Padrões		
4.1. Campo				
Categorias	Básica	C1	C2	S1 e S2
Rotação (Ciclo agrícola)	-	-	-	-
Isolamento ou Bordadura (mínimo em metros)	3	3	3	3
Número máximo de <i>off-type</i> (plantas atípicas)	1/2.000	1/1.000	1/700	1/350
Feijão miúdo (<i>Vigna unguiculata</i>)	zero	zero	zero	Zero
Número mínimo de vistorias	2	2	2	2
Área máxima da gleba para vistorias	50	50	50	100
4.2. Semente:				

Semente Pura (% mínima)	99,0	99,0	99,0	99,0
Material Inerte (%)	-	-	-	-
Outras sementes (% máxima)	zero	0,05	0,08	0,1
Semente de outra espécie cultivada	zero	Zero	1	2
Semente silvestre	zero	1	1	1
Semente nociva tolerada	zero	1	1	2
Semente nociva proibida	zero	zero	zero	Zero
Outras cultivares (nº máximo)	2	3	5	10
Germinação (% mínima)	75	80	80	80
Pragas	-	-	-	-
5. Val. teste de germinação (meses)	6	6	6	6
6. Val. reanálise do teste de germinação (meses)	3	3	3	3
7. Prazo p/ solicitação inscrição de campo (dap)*	30	30	30	30

*dap: dias após a semeadura

Fonte: Adaptado da IN nº 9, de 02 de Junho de 2005. Citado por APASSUL, 2011

As demais categorias de sementes reconhecidas pelo MAPA são Semente Certificada (1ª classe - C1 e 2ª classe - C2), resultante da multiplicação da Semente Básica ou Certificada (primeira classe) e a categoria Semente Fiscalizada (1ª classe - S1 e 2ª classe - S2), resultante da multiplicação de Semente Básica, Certificada ou Fiscalizada (primeira classe). A categoria mais comumente oferecida ao mercado para a cultura da soja é a de Semente Fiscalizada (FIGURA 1).

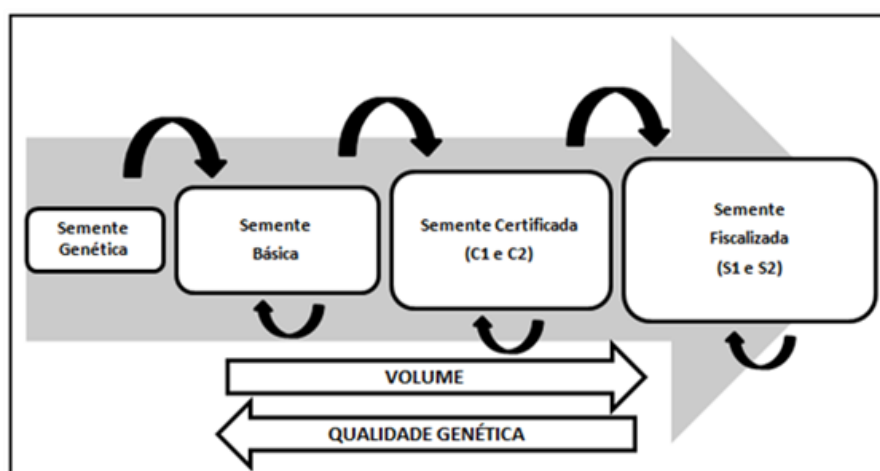


FIGURA 1 Esquema das categorias de sementes de soja no Brasil
Fonte: Adaptado de Brasil, 2011)

1.2.3 Estádios fenológicos e sua importância na inspeção de campos de produção de sementes

A classificação dos estádios fenológicos da cultura da soja identifica precisamente o estágio de desenvolvimento em que se encontra uma planta ou uma lavoura de soja. A exatidão na identificação dos estádios não só é útil, mas absolutamente necessária, pois facilita o reconhecimento do real estágio de desenvolvimento da cultura, eliminando as interpretações subjetivas que possam existir (FEHR e CAVINESS, 1977).

TABELA 2 Estádios fenológicos da cultura da soja

Estádio	Denominação	Descrição
VE	emergência	Cotilédones acima da superfície do solo.
VC	cotilédone	Cotilédones completamente abertos.
V1	primeiro nó	Folhas unifolioladas completamente desenvolvidas.
V2	segundo nó	Primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida.
V3	terceiro nó	Segunda folha trifoliolada completamente desenvolvida.
V4	quarto nó	Terceira folha trifoliolada completamente desenvolvida.
V5	quinto nó	Quarta folha trifoliolada completamente desenvolvida.
V6	sexto nó	Quinta folha trifoliolada completamente desenvolvida.
V...	...	...
Vn	enésimo nó	Ante-enésima folha trifoliolada completamente desenvolvida.
R1	Início do florescimento	Uma flor aberta em qualquer nó do caule (haste principal).
R2	Florescimento pleno	Uma flor aberta num dos dois últimos nós do caule com folha completamente desenvolvida.
R3	Início da formação da vagem	Vagem com 5 mm de comprimento num dos quatro últimos nós do caule com folha completamente desenvolvida.
R4	Vagem completamente desenvolvida	Vagem com 2 cm de comprimento num dos quatro últimos nós do caule com folha completamente desenvolvida.
R5	Início do enchimento do grão	Grão com 3 mm de comprimento em vagem num dos quatro últimos nós do caule, com folha completamente desenvolvida.
R6	Grão cheio ou completo	Vagem contendo grãos verdes preenchendo as cavidades da vagem de um dos quatro últimos nós do caule, com folha completamente desenvolvida.
R7	Início da maturação	Uma vagem normal no caule com coloração de madura.
R8	Maturação plena	95% das vagens maduras.

Fonte: FEHR; CAVINESS, 1977.

As inspeções nos campos de produção podem ser realizadas durante todos os estádios fenológicos da cultura, mas são mais eficientes quando realizadas em estádios em que os caracteres morfológicos são mais evidentes e a distinção de plantas atípicas se torna mais eficiente.

No caso da soja, os estádios iniciais de desenvolvimento (V1 e V2), o florescimento (R1, R2) e os estádios finais de maturação (R6, R7, R8) são os estádios fenológicos que permitem maior eficiência na distinção de plantas atípicas dentro dos campos de produção de sementes.

1.2.4 Componentes morfológicos utilizados na caracterização de cultivares

A planta de soja apresenta, para a maioria de suas características morfológicas, variabilidade entre as cultivares disponíveis no mercado, que são ainda influenciadas pelo ambiente em sua maioria (ALLARD, 1971). A altura da planta varia muito em função da genética e do ambiente. Uma mesma cultivar pode apresentar um porte de 120 cm em latitudes em torno de 25 graus Sul e 50 cm em latitudes próximas a 10 graus Sul, fator relacionado à característica de Período Juvenil Longo. Seu desenvolvimento completo, para as condições de plantio nas regiões produtoras do Brasil leva entre 75 dias para as cultivares cujo grupo de maturação seja considerado precoce para determinada região, podendo estender-se por até 200 dias para cultivares de grupo de maturação considerado tardio.

Entre os caracteres morfológicos utilizados a campo para identificação e caracterização de cultivares, alguns possuem controle genético monogênico, como é o caso do caráter cor de flor, cujo controle genético se encontra na TABELA 3. Segundo Verneti (1983), outros genes estão ligados ao fenótipo cor de flor em soja. No entanto o gene W_1 é o gene que condiciona cor à flor, sendo os demais relacionados à tonalidade da característica.

TABELA 3 Controle genético da cor de flor em soja

W_1 ____	flor púrpura (ou roxa)
$W_1 W_1$	flor branca

Fonte: Verneti, 1983

Características com controle genético monogênico e dominância completa são importantes na caracterização de cultivares, pois, salvo exceções, não sofrem interação com o ambiente a ponto de modificar sua classe fenotípica. No entanto, são caracteres de utilização limitada na distinção de cultivares, uma vez que o número de classes fenotípicas possíveis é de apenas dois fenótipos. Dessa forma, um grande número de cultivares apresentará a mesma classe fenotípica, sendo difícil a distinção com base apenas em características com esse controle genético.

A seguir, descrevem-se algumas características morfológicas que são utilizadas para a descrição de cultivares de soja no Brasil.

1.2.4.1 Caule e tipo de crescimento

O caule da soja é do tipo herbáceo, ereto, pubescente e ramificado, desenvolvendo-se a partir do eixo embrionário após a germinação. O hipocótilo é a primeira porção desenvolvida do caule, podendo ser utilizado como marcador morfológico a partir da presença ou ausência de antocianina, o que está diretamente correlacionado com a cor de flor na planta. O genótipo (dt_1dt_1) é responsável pelo tipo de crescimento determinado, e o (Dt_1Dt_1) pelo tipo de crescimento indeterminado. Já o genótipo heterorigoto (Dt_1dt_1) condiciona fenótipo tipo semideterminado. O gene (Dt_2/dt_2) na sua forma

dominante também causa o fenótipo semideterminado na presença de (Dt_1 ___). Já o genótipo (dt_1) é epistático em relação a (Dt_2/dt_2) (VERNETTI *et al*, 1983).

O desenvolvimento terminal do caule é dependente do tipo de crescimento da planta, podendo ser categorizado como:

- a) crescimento determinado: com grande número de ramificações, a partir das quais se permite grande produção de flores e posteriormente vagens, com crescimento limitado ao início do florescimento (FIGURA 2);



FIGURA 2 Planta com tipo de crescimento determinado

- b) crescimento indeterminado: com pequeno número de ramificações, produção centralizada no ramo central da planta e crescimento podendo se estender após o início do florescimento, permitindo a presença de legumes e flores concomitantemente na mesma planta (FIGURA 3);



FIGURA 3 Planta com tipo de crescimento indeterminado

- c) crescimento semideterminado: apresenta crescimento que termina quase tão abruptamente quanto nas de tipo de crescimento determinado, mas com florescimento quase tão longo como nas cultivares de tipo indeterminado (FIGURA 4).



FIGURA 4 Planta com tipo de crescimento semideterminado

1.2.4.2 Folhas

O desenvolvimento das plantas se inicia mediante o desenvolvimento das folhas cotiledonares, que são oriundas dos cotilédones da semente que originou a plântula e é responsável pelo seu fornecimento energético durante o estágio de plântula. As folhas unifolioladas são inseridas opostamente ao primeiro nó, acima do nó cotiledonar. As folhas trifolioladas produzidas no caule principal são compostas por três folíolos, podendo ter diferentes formatos, desde oval a lanceolada (FIGURA 5).



FIGURA 5 Trifólio de folhas ovaladas (A) e trifólio de folhas lanceoladas (B) de soja

1.2.4.3 Pubescência

Caule, pecíolos, folhas e legumes da soja são normalmente cobertos por tricomas, comumente denominados pubescência. Tal característica pode apresentar duas colorações, o cinza e o marrom, sendo que para essa última cor pode-se encontrar subdivisões na literatura como marrom claro e marrom escuro (FIGURA 6).



FIGURA 6 Pubescência marrom (A) e pubescência cinza (B) em plantas de soja.

1.2.4.4 Hipocótilo

O hipocótilo é a estrutura da planta de soja responsável por elevar o cotilédone (folha cotiledonar) acima do nível do solo. Sua coloração é influenciada pela presença ou pela ausência de antocianina na planta e está correlacionada com a cor de flor em soja: a coloração púrpura (ou roxa) indica a presença de antocianina na planta e está correlacionada com flor de coloração roxa. Já a coloração verde do hipocótilo indica ausência de antocianina na planta e está correlacionada à cor de flor branca (FIGURA 7).

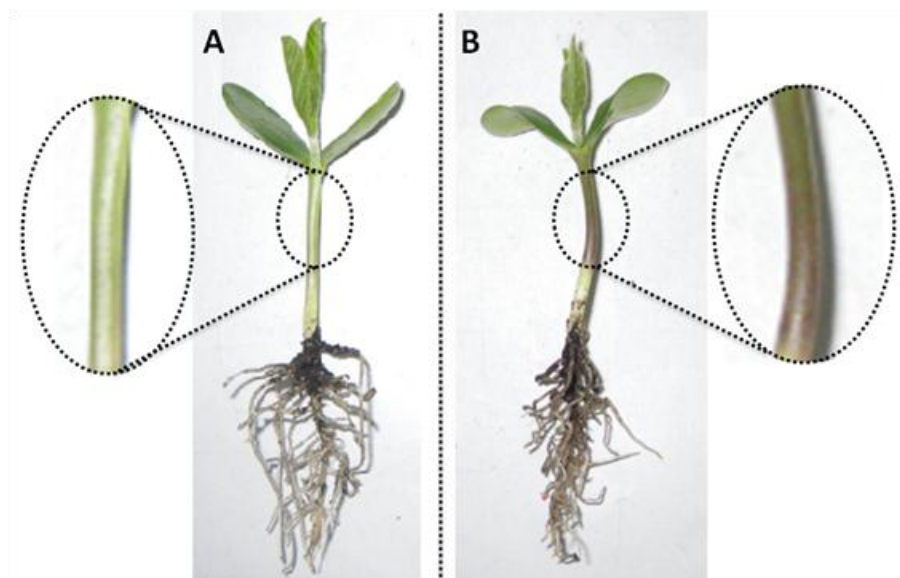


FIGURA 7 Detalhe de plântula de soja com hipocótilo verde (A) e hipocótilo roxo (B).

1.2.4.5 Flores

A cor da flor em soja é uma característica extremamente importante para a caracterização e distinção de cultivares. As cores de flor encontradas em soja são branca e púrpura, comumente caracterizada como roxa. A tonalidade de púrpura encontrada em cada cultivar é dependente de sua constituição genética e a antocianina é responsável pela coloração, como já citado para hipocótilo. Às

vezes, nas plúmulas, é encontrada a pigmentação por antocianina. O grau de formação e a intensidade da antocianina variam muito, mas nunca se formam em plantas de flor branca, sendo uma ótima ferramenta como marcador morfológico (JOHNSON; BERNARD, 1963) (FIGURA 8).



FIGURA 8 Flor branca (A) e flor roxa (B) em soja.

1.2.4.6 Legume

A forma e cor do legume de soja, comumente chamado de vagem, variam de cultivar para cultivar. A forma varia desde a achatada até a ovalada, quase cilíndrica, conforme a forma da semente que o legume contém. A cor varia desde amarelo palha, passando por tonalidades de marrom até a preta. É preciso ressaltar que a cor da pubescência pode interferir na observação da cor do legume, sendo usual na caracterização de cultivares a raspagem da pubescência da superfície do legume para determinar-se corretamente a sua cor (BERNARD, 1967).

O legume pode ser ainda utilizado como marcador morfológico com relação à pigmentação por antocianina em sua superfície. Em plantas com a presença de antocianina, é comum a presença de pigmentação escura na face do legume que fica em maior exposição ao sol, como mostra a FIGURA 9. Esse marcador pode ser correlacionado com a coloração roxa na flor e no hipocótilo das plantas.



FIGURA 9 Pigmentação por antocianina em legumes de plantas de soja.

As plantas (A) e (D) apresentam pigmentação arroxada nas vagens do ápice da planta, em maior exposição ao sol, em função da presença de antocianina na planta (correlacionado com flor e hipocótilo roxos). As plantas (B) e (C) não apresentam a pigmentação.

1.2.4.7 Semente

A forma da semente varia de arredondada a elíptica, ou achatada, nesse último caso lembrando uma semente de feijão. O tamanho varia de 4 a 55 gramas por 100 sementes, sendo que na maioria das cultivares comerciais varia de 12 a 18 gramas por 100 sementes. O hilo, ponto de fixação da semente à vagem, tem forma de uma elipse longa. A pigmentação do tegumento (casca) da semente e do hilo varia segundo a constituição genética da cultivar. Três cores encontradas no tegumento da semente de soja são determinadas por fatores não genéticos e não podem ser utilizadas na caracterização de cultivares. São elas: mancha purpúrea, provocada pelo ataque do patógeno *Cercospora kikuchi*; mancha fuliginosa, provocada pela infiltração do pigmento do legume no pigmento da semente, principalmente em cultivares de legume de cor preta; e mancha café, relacionado ao ataque do vírus do mosaico da soja (VERNETTI *et al.*, 1983).

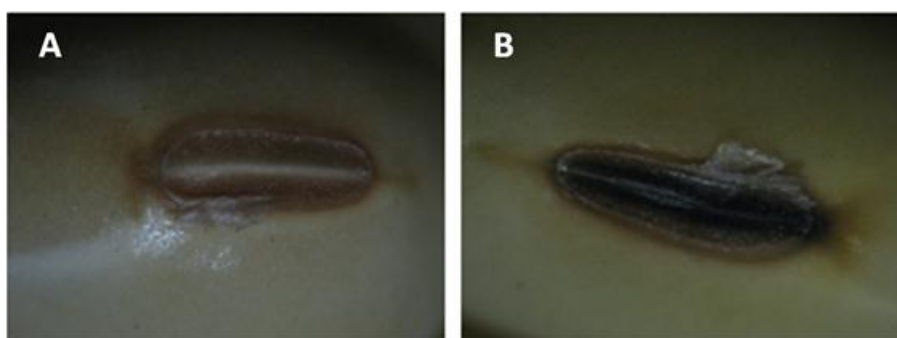


FIGURA 10 Detalhe de hilo em sementes de soja. Hilo de cor marrom clara (A) e hilo de cor preta (B).

Ao se estudar a herança de caracteres da semente, é preciso não esquecer que o tegumento é um tecido de origem materna e que o embrião pertence à geração seguinte. Portanto, os tegumentos de todas as sementes de uma planta têm a mesma constituição genética.



FIGURA 11 Brilho de tegumento em sementes de soja. Tegumento fosco (A) e tegumento brilhante (B).

A cor do tegumento e a cor do hilo (FIGURA 10) da semente são determinadas pela ação conjunta de vários genes. A cor mais comum em tegumentos de sementes de soja comercial é a amarela, podendo variar tanto em sua tonalidade quanto ao brilho (FIGURA 11). No entanto, várias cores com menor valor comercial para a indústria de processamento, em virtude de não serem aceitas na indústria de óleo, são relatadas, tais como verde, marrom, preta ou bicolor. Já com relação ao hilo,

as cores mais comumente encontradas são preto, preto imperfeito, marrom, marrom claro, amarelo e cinza.

O tegumento das sementes de soja é utilizado na realização das análises de peroxidase (FIGURA 12). A enzima peroxidase está relacionada com a regulação da permeabilidade das membranas e formação da parede celular. O teste é realizado avaliando-se a coloração da membrana após ser embebida em guaiacol e água oxigenada. Trata-se de uma característica de controle genético monogênico, em que os tegumentos com alta atividade da enzima peroxidase produzem uma coloração marrom-avermelhada, definida como reação positiva, enquanto os tegumentos com baixa atividade enzimática não produzem coloração, sendo definidos como reação negativa (DE JONG, 1967).

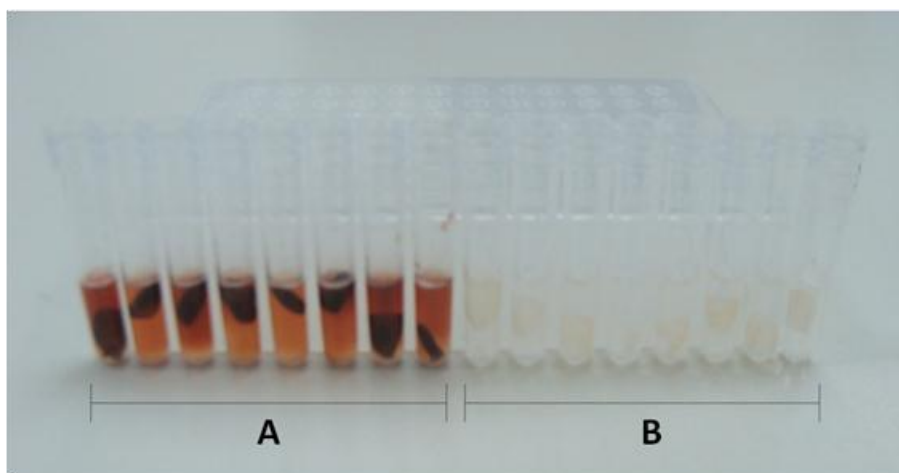


FIGURA 12 Análise de peroxidase em soja com resultados de reação positiva (A) e reação de negativa (B)

1.2.5 Interação genótipo x ambiente e sua influência na produção de sementes

O fenótipo de um indivíduo ou de uma população é expresso pelo genótipo em adição ao ambiente em que está exposto, além da interação entre os dois fatores ($F = G + A + G \times A$). As características fenotípicas de uma planta são as que podem ser visualizadas. Quando indivíduos de uma mesma população apresentam diferenças fenotípicas, tal fato pode estar relacionado à genética do indivíduo ou apenas ao efeito do ambiente a que foram expostos (ALLARD, 1971).

Determinadas características utilizadas na caracterização de cultivares possuem controle genético poligênico, sendo controladas pela ação conjunta de vários genes. Para características com esse tipo de controle genético é comum que haja interação do genótipo com o ambiente. No caso do ciclo da cultura da soja, comumente determinado por meio de grupos de maturidade relativa, apresenta forte interação com o ambiente, principalmente luminosidade, latitude, altitude, temperatura, entre outros fatores, o que dificulta a parametrização de caracteres com esse controle genético.

A interação do genótipo com o ambiente pode ser avaliada na população, quando todos os indivíduos são expostos a uma determinada condição e se expressam de forma homogênea, ou de forma individual, quando indivíduos dentro de uma população são expostos a condições distintas e sua

interação com aquele ambiente específico gera um fenótipo diferente dos demais indivíduos da população. É elementar avaliar se sua constituição genética é idêntica à dos demais indivíduos da população, tendo a diferença na característica avaliada sido provocada apenas pelo efeito do ambiente.

Diferenças fenotípicas de um indivíduo de uma população com manutenção de sua constituição genética podem ser detectadas, por exemplo, quando uma planta é exposta a um patógeno. A podridão preta da raiz e a síndrome da morte súbita, provocadas, respectivamente, pelos fungos *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium solani* (KIMATI *et al.*, 1997), comumente encontradas em lavouras de soja, podem acometer indivíduos isolados dentro da população, gerando morte prematura e diferença fenotípica. Outro exemplo é quando uma condição local provoca diferença no sistema radicular da planta e ela tem seu desenvolvimento alterado com relação aos demais indivíduos da população, o que pode acontecer por proximidade da semente com relação ao adubo, por exemplo. Outro ambiente que pode gerar alteração no fenótipo é quando uma planta encontra uma condição diferenciada de fertilidade no solo, como uma mancha provocada por esterco bovino, desenvolvendo-se mais que as demais e provocando dúvidas na análise quando se considera apenas o fenótipo. Ataques de insetos, principalmente percevejos, causam hastes verdes e retenção de folhas em soja, provocando diferenças no final do ciclo das plantas acometidas na lavoura. Enfim, diversos fatores, bióticos e abióticos, podem gerar alteração no fenótipo de indivíduos com mesmo genótipo.

1.2.6 Melhoramento genético e desenvolvimento de cultivares

Baseado nas demandas de mercado, os programas de melhoramento genético de plantas desenvolvem cultivares de soja. Cada empresa possui um programa de melhoramento com estratégias e objetivos diferentes. Em grande parte das vezes, o foco é a obtenção de cultivares mais produtivas, mas há também a demanda por cultivares que expressem resistência a fitopatógenos, como nematoides e insetos, a fatores abióticos, como estresse hídrico ou estresse por salinidade, ou até mesmo por demandas específicas, como alto teor de óleo ou de proteína.

Sendo a soja uma cultura autógama, o objetivo é a obtenção de linhagens puras, com grau de homozigose próximo de 100% para disponibilizar ao mercado. O processo parte da seleção dos genitores com características de interesse e, a partir daí, cabe ao melhorista a seleção dos indivíduos com maior capacidade de se tornarem linhagens promissoras. Para a obtenção dessas linhagens puras, os programas de melhoramento utilizam diferentes métodos de condução das populações segregantes. Segundo descreveram Briggs e Knowles em 1967, os métodos mais tradicionais são o Genealógico ou Método do *Pedigree* e o Método de População, também conhecidos como Massal ou *Bulk*. Atualmente, diversos autores descrevem variações desses métodos, mas o conceito de condução de populações segregantes é fortemente baseada nessas metodologias. A principal diferença entre eles é que, no Método Genealógico, são realizadas seleções de plantas nas gerações iniciais de segregação,

como F₂ a F₄, a partir das quais são plantadas linhas que darão origem a famílias (manutenção da genealogia). Já no Método de Populações, as gerações segregantes até F₅ são utilizadas apenas para avanço de endogamia e a seleção de plantas é realizada apenas a partir de F₅, em que o percentual de heterozigose já é considerado baixo (TABELA 4) e permite a seleção de progênies.

TABELA 4 Geração de endogamia, frequência esperada de indivíduos heterozigotos e homozigotos e número esperado de indivíduos heterozigotos e homozigotos recessivos, por hectare.

Geração de endogamia	Frequência esperada indivíduos heterozigotos	Frequência esperada de indivíduos homozigotos	Número esperado de indivíduos heterozigotos/ha*	Número esperado de indivíduos homozigotos recessivos/ha
F1	100,0%	0,0%	300.000	
F2	50,0%	50,0%	150.000	75.000
F3	25,0%	75,0%	75.000	37.500
F4	12,5%	87,5%	37.500	18.750
F5	6,25%	93,75%	18.750	9.375
F6	3,125%	96,875%	9.375	4.688
F7	1,5625%	98,4375%	4.688	2.344
F8	0,7813%	99,2188%	2.344	1.172
F9	0,3906%	99,6094%	1.172	586
F10	0,1953%	99,8047%	586	293
F11	0,0977%	99,9023%	293	146
F12	0,0488%	99,9512%	146	73
F13	0,0244%	99,9756%	73	37
F14	0,0122%	99,9878%	37	18
F15	0,0061%	99,9939%	18	9

*considerando-se uma população de 300.000 plantas/ha

O processo de produção de sementes inicia-se dentro do programa de melhoramento, a partir do momento em que as linhagens já se encontram em alto grau de endogamia. Usualmente, o processo de produção se inicia a partir das gerações F₆ a F₈, de forma que o grau de heterozigose dentro da linhagem não gere viés no processo de produção de sementes, como, por exemplo, seleção de indivíduos para avanço da produção de sementes que não correspondam à linhagem, em virtude do avanço de indivíduos heterozigotos para determinadas características dentro da população.

Para os campos de produção de sementes, principalmente da categoria Semente Básica, em que o número de indivíduos atípicos tolerado é baixo e são passíveis de fiscalização por parte dos órgãos competentes, é necessário que haja conhecimento do controle genético das características avaliadas e do grau de endogamia da população. Nos campos de produção de sementes, categoria Semente Básica, o índice tolerado de plantas atípicas é de uma planta em 2.000 avaliadas, conforme informado na TABELA 1. Em campos de produção para essa categoria cuja geração de endogamia esteja abaixo de F11, e para os quais a classe fenotípica de marcadores morfológicos como cor de flor, de controle genético monogênico, por exemplo, forem dominantes, a probabilidade, mesmo com a realização de *roguing*, de aparecer um número de indivíduos *off-type* para essas características

superiores ao que permite a legislação vigente é alta. Isso devido ao fato de que, em F10, por exemplo, o número de indivíduos recessivos com a classe fenotípica recessiva *off-type* para a população (flor branca - genótipo *ww*) em campo de flor roxa (genótipo - *WW* e *Ww*) é de 0,0977% (F9 com 0,3906% indivíduos com genótipo *Ww*, resultando na geração F10 em 25% desses indivíduos com genótipo *ww*, fenótipo flor branca), ou seja, em 2.000 plantas a frequência esperada de *off-type* para esse fenótipo será de 1,9 indivíduos, conforme ilustra a TABELA 4.

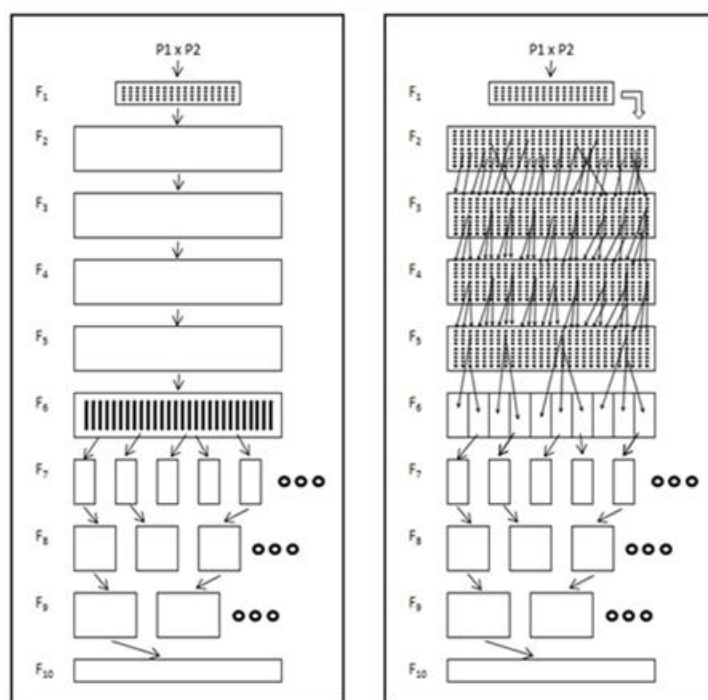


FIGURA 13 Esquema dos métodos de condução de populações segregantes de espécies autógamas. À direita, método genealógico ou *pedigree*; à esquerda, método massal ou *bulk*
Fonte: BRIGGS e KNOWLES, 1967

1.3 Marcadores moleculares em espécies vegetais

Nas últimas décadas, o desenvolvimento e a aplicação das técnicas de marcação molecular induziram transformações consideráveis em diversos ramos da Biologia, notadamente a Biologia Molecular, a Genética Evolutiva, a Genética Quantitativa (detecção e identificação de *locus* que controlam QTL), e o melhoramento genético (seleção assistida por marcadores) (NAJIMI *et al.*, 2003).

Um marcador molecular é um *locus* polimórfico que informa sobre o genótipo do indivíduo que o possui. Dessa maneira, os marcadores correspondem ao polimorfismo presente no nível do DNA. A análise desse polimorfismo por meio da Biologia Molecular é endereçada ao genoma como um todo, traduzido ou não em proteínas, e é independente das condições ambientais. Contrariamente aos marcadores morfológicos, os marcadores moleculares não dependem do tipo de tecido analisado, nem do estágio de desenvolvimento da planta. Atualmente, esses marcadores são utilizados com as mais diversas finalidades genéticas, podendo ser usados, em função de sua estabilidade e

independência de fatores ambientais, para caracterização e para certificação de pureza genética de plantas (ROCHA *et al.*, 2003).

O número de marcadores genéticos é teoricamente ilimitado e o genótipo de uma planta pode ser determinado em um estágio de desenvolvimento precoce, assim que haja material suficiente para a extração do DNA. Em razão dessas características, os marcadores moleculares são uma ferramenta cada vez mais útil no melhoramento genético de culturas de valor agrônômico, sobretudo para características de difícil seleção fenotípica (MALUF *et al.*, 2005). Em função de sua estabilidade e da independência do fenótipo, os marcadores moleculares são ferramentas seguras na distinção de *off-type* em campos de produção de sementes, quando apenas a avaliação fenotípica pode gerar erros em avaliações de características que podem ser alteradas pelo ambiente.

Inúmeras técnicas de marcação molecular estão disponíveis atualmente (RAFALSKI, 2002). As características de cada uma, seus domínios de aplicação, seus princípios e seus custos são bem descritos. Os métodos de marcação podem ser reunidos em duas grandes categorias: os marcadores do tipo RFLP (análise de restrição de fragmentos polimórficos ou *Restriction Fragment Length Polymorphism*, em inglês) e os marcadores baseados no método PCR (reação da polimerase em cadeia ou *Polymerase Chain Reaction*, em inglês) (BORÉM; CAIXETA, 2006).

A metodologia para a marcação molecular mais promissora atualmente são os marcadores do tipo SNP ou *Single Nucleotide Polymorphism*, baseados na identificação de polimorfismo em sequências em que houve deleção/inserção ou mutação de apenas um nucleotídeo (RAFALSKI, 2002). Os marcadores SNP são abundantes, aumentando a possibilidade de sucesso em diversas aplicações, como a construção de mapas genéticos de alta resolução, o mapeamento de QTL, o diagnóstico genético, a análise da estrutura genética da população, a filogenia, a pureza genética, entre outras (CHOI *et al.*, 2007).

2 MATERIAL E MÉTODOS

A fim de propor uma ferramenta complementar no processo de qualidade de produção de sementes de soja com foco em pureza genética, foram avaliadas linhagens desenvolvidas no Brasil pelos programas de melhoramento genético de soja da empresa Syngenta Seeds Ltda., usando-se informações fenotípicas e genotípicas, conforme etapas descritas a seguir.

2.1 Etapa I: Fenotipagem para caracteres morfológicos

No ano de 2009, foram realizados três experimentos nas estações experimentais da Syngenta Seeds Ltda., localizadas nos municípios de Uberlândia-MG, em Lucas do Rio Verde-MT e em Cascavel-PR, com a finalidade de caracterizar fenotipicamente cada linhagem em sua região de adaptação. Cada linhagem foi caracterizada dentro da estação experimental que corresponde ao programa de melhoramento genético onde foi desenvolvida. A nomenclatura das linhagens foi preservada, sendo substituídas por códigos – Linhagem 1 (L1) a Linhagem 10 (L10).

Os caracteres morfológicos utilizados para a caracterização das linhagens foram definidos utilizando-se a TABELA 5. Os caracteres utilizados na descrição foram extraídos do grupo de 38 caracteres propostos pelo MAPA, utilizados para execução de ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de soja conduzidos por empresas de sementes, segundo as recomendações do Serviço Nacional de Proteção de Cultivares.

TABELA 5 Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merril)

Característica	1*	2**	3***	4****
1. Plântula: pigmentação antocianínica do hipocótilo	VC	QL	ausente presente	1 2
2. Apenas para cultivares com presença de antocianina no hipocótilo: Plântula: intensidade da pigmentação antocianínica do hipocótilo	VC	QN	fraca média forte	3 5 7
3. Flor: cor predominante	R2	QL	branca roxa	1 2
4. Folha: intensidade da cor verde	R4	QN	fraca média forte	3 5 7
5. Folha: forma do folíolo lateral	R4	PQ	lanceolada estreita lanceolada triangular oval-pontiaguda oval-arredondada	1 2 3 4 5
6. Folha: tamanho do folíolo lateral	R4	PQ	pequeno médio grande	3 5 7
7. Planta: tipo de crescimento	R8	QL	determinado semideterminado	1 2

			indeterminado	3
8. Planta: altura	R8	QN	baixa	3
			média	5
			alta	7
9. Hábito de crescimento (inclinação dos ramos)	R8	PQ	ereto	1
			semiereto	3
			horizontal	5
10. Planta: cor da pubescência na haste principal	R8	QL	cinza	1
			marrom clara	2
			marrom média	3
11. Planta: densidade da pubescência na haste principal	R8	QN	baixa	3
			média	5
			alta	7
12. Vagem: (com pubescência): cor	R8	QL	cinza clara	1
			cinza escura	2
			marrom clara	3
			marrom média	4
			marrom escura	5
13. Ciclo vegetativo: emergência à floração	R1	QN	precoce	3
			médio	5
			tardio	7
14. Ciclo total: emergência à maturação	R8	QN	precoce	3
			semiprecoce	4
			médio	5
			semitardio	6
			tardio	7
15. Grupo de maturidade relativa		QN	grupo de maturidade relativa	4.0 a 10.0
16. Transgenia		QL	ausente	1
			presente	2
17. Semente: tamanho predominante		PQ	pequena	3
			média	5
			grande	7
18 - Semente: forma		PQ	esférica	1
			esférica-achatada	2
			alongada	3
			alongada-achatada	4
19. Semente: intensidade do brilho do tegumento		QN	baixo	3
			médio	5
			alto	7
20. Semente: cor do tegumento (excluído o hilo)		PQ	amarela	1
			amarela-esverdeada	2
			verde	3
			marrom clara	4
			marrom média	5
			marrom escura	6
			preto	7
21. Semente: cor genética do hilo		PQ	cinza	1
			amarelo	2
			marrom claro	3
			marrom médio	4
			preto imperfeito	5
			preto	6
22. Semente: reação à peroxidase		QL	positiva	1
			negativa	2

*Momento Avaliação

** Tipo Característica

*** Classe da Característica

**** Classificação

QL: Característica qualitativa;

QN: Característica quantitativa;

PQ: Característica pseudo-qualitativa;

MG: Mensuração grupal: medidas simples de um grupo de plantas ou partes de plantas;

Legenda:

MI: Mensuração individual: medidas efetuadas em várias plantas, ou partes de plantas, individualmente

VG: Visualização grupal: avaliação mediante uma única observação de grupos de plantas ou partes de plantas;

VI: Visualização individual: avaliação mediante a observação de várias plantas, ou partes de plantas, individualmente.

Fonte: BRASIL, 2011

2.2 Etapa II: Detecção dos *off-type* fenotípicos

Para multiplicação dos blocos e incremento das sementes das linhagens, foi implantado um campo de produção em um pivô central na região de Planura-MG, na safra de inverno do ano 2010. Cada linhagem foi plantada isoladamente, respeitando-se a distância de três metros entre linhagens.

Durante o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da lavoura, foram realizados os *roquings* para manutenção da qualidade genética, utilizando-se como padrão para o acompanhamento e caracterização das linhagens os descritores definidos na Etapa I. Entre os estádios fenológicos R6 e R7 foi realizada uma avaliação fenotípica em cada linhagem individualmente, em que foi feita a análise visual do padrão da linhagem e dos caracteres morfológicos do campo de produção, tais como uniformidade, porte, ciclo, tipo de crescimento, pubescência, entre outras características. Definido o padrão fenotípico, os caracteres foram comparados com os descritores pré-definidos para a linhagem, realizados na fenotipagem previamente descrita na Etapa I.

Para os dados mais passíveis de interação com o ambiente, como ciclo e altura de planta, a aferição foi realizada de forma qualitativa, e não comparativa. Por meio de uma régua graduada, foi coletada a altura, em centímetros, de cada linhagem. Foi considerada como altura da linhagem a média entre dez pontos aleatórios no campo, coletados no momento da colheita. Para a medição do ciclo dos genótipos em estudo, foi utilizada a contagem, em dias, para cada fase. Para o Ciclo Vegetativo, foi realizada a contagem, em dias, desde a emergência à emissão da primeira flor (R1). Para o Ciclo Total, foi realizada a contagem, em dias, desde a emergência à maturação plena (R8).

Após a caracterização do aspecto geral da lavoura, foram amostradas dez plantas de cada linhagem, categorizadas dentro do fenótipo padrão da lavoura em função de todos os descritores avaliados. As dez plantas foram definidas como “plantas-padrão”, para fins de comparação na análise de DNA. Em sequência, foram identificadas nos campos as plantas definidas como *off-type*, ou seja, plantas com uma ou mais características distintas dos caracteres definidos como padrões para a linhagem. Os *off-type* considerados para a avaliação foram coletados nos meses de agosto e setembro de 2010, respeitando-se o ciclo das linhagens e o estágio fenológico R6 e R7 para identificação das plantas atípicas e respectiva coleta para análise de DNA. Na coleta de *off-type* para a análise genotípica, desconsideraram-se características morfológicas de herança simples, como, por exemplo, cor de pubescência, para a qual a simples detecção de diferença fenotípica já deve ser considerada diferença genética. Foram considerados para a avaliação apenas *off-type* de caráter genético mais complexo, como ciclo e porte de planta. Entretanto, não se definiu um número específico de *off-type* para a coleta, pois não havia um número padronizado de plantas atípicas entre as linhagens.

2.3 Etapa III: Validação genotípica

Após coletadas, as plantas padrão e as plantas consideradas *off-type* fenotípicos das dez linhagens foram encaminhadas para o Laboratório de Genética Molecular da Syngenta Seeds Ltda., na cidade de Uberlândia-MG.

Para as análises genotípicas, foram utilizados vinte marcadores moleculares SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), definidos com base em sua alta diversidade genética, utilizando-se um marcador para representar cada cromossomo da soja. Dessa forma, tentou-se cobrir todo o genoma da soja, com vistas a uma diferenciação entre linhagens de acordo com o perfil genotípico estabelecido por esse conjunto de SNPs. Os marcadores SNPs utilizados não estavam necessariamente ligados à expressão de nenhuma característica fenotípica específica. A extração do DNA foi realizada a partir das folhas oriundas de plântulas das sementes germinadas, coletadas das plantas “padrão” e “*off-type*”.

O DNA extraído foi submetido à análise via PCR (*Polimerase Chain Reaction*), utilizando-se o protocolo “*TaqMan® SNP Genotyping Protocol*”, da *Applied Biosystems*.

Foram realizadas as análises genotípicas das dez plantas consideradas “padrão fenotípico” para cada linhagem. Após a análise das dez plantas individualmente, foi definido o padrão genotípico de cada linhagem para os vinte marcadores SNPs utilizados. O padrão genotípico das dez plantas foi transformado em um dado único (*fingerprint*), utilizado para comparação com os dados genotípicos das plantas consideradas *off-type* fenotípicos.

Após definido o perfil genotípico de cada linhagem (*fingerprint*), ele foi confrontado com o perfil genotípico das plantas consideradas *off-type* utilizando-se métodos estatísticos baseados no conceito de intervalo de confiança.

2.4 Análises estatísticas

Para efeito de análise estatística, os dados foram submetidos a estatística não paramétrica, por meio do cálculo do intervalo de confiança, ao nível de 95%, conforme cálculo:

$$IC(p)_{1-\alpha}: \hat{p} \pm e$$

$$p = \hat{p} \pm z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n}}$$

onde: $\sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n}}$ = desvio padrão da amostra

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises fenotípicas realizadas para a caracterização das linhagens utilizando-se as 22 características recomendadas pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) permitiram o estabelecimento de um padrão morfológico único para cada linhagem. Na TABELA 6 estão apresentados os dados fenotípicos avaliados para as dez linhagens estudadas. A avaliação fenotípica das linhagens L1 e L3 permitiu distingui-las por meio de diferença fenológica para apenas uma das 22 características analisadas. Somente a característica Grupo de Maturidade Relativa (item 15 - GM) permitiu a diferenciação dessas linhagens, sendo as demais 21 características idênticas para ambas. Esse fato é explicado pelo fato de duas linhagens serem oriundas de um mesmo cruzamento biparental (linhagens irmãs). Outro par de linhagens que se diferenciou em apenas uma das características analisadas compôs-se pelas linhagens L2 e L4, também dicotomizadas apenas para a característica Grupo de Maturidade Relativa.

A TABELA 7 apresenta os valores para as características avaliadas de forma distinta na geração de inverno - Altura de Planta (8), Ciclo Vegetativo (13), Ciclo Total (14).

Alliprandini *et al.* (2009), estudando o Grupo de Maturidade Relativa (GM), utilizaram 48 cultivares de soja adaptadas à região central do Brasil e 40 cultivares adaptadas à região sul do Brasil. Eles constataram que o efeito de local foi muito importante na influência de número de dias para florescimento e número de dias para a maturação, para as cultivares analisadas. No mesmo estudo, foi salientado que o GM não é um índice absoluto, devendo ser realizado em comparação entre cultivares e em local preestabelecido. Baseado nesse estudo, o fator Grupo de Maturidade Relativa (15) foi desconsiderado na avaliação *off-season*, levando-se em consideração apenas o número de dias para a maturação.

Os dados coletados em *off-season* para as características quantitativas Altura de Planta (8), Ciclo Vegetativo (13) e Ciclo Total (14) sofreram alterações quando comparados aos resultados obtidos no ambiente de verão e local de adaptação das respectivas linhagens. A linhagem L2 apresentou na geração de verão um Grupo de Maturidade Relativa (GM) 8.6. Já a linhagem L3 apresentou no verão GM 8.4. Na geração *off-season* as linhagens L2 e L3 apresentaram o mesmo número de dias para atingirem o estágio R8, 135 dias. O mesmo ocorreu entre as linhagens L7 e L9, respectivamente, com GM 8.0 e 8.1 no plantio de verão e ambas com ciclo de 127 dias no inverno para atingirem R8. Já a linhagem L4 apresentou no verão GM 8.5, enquanto a linhagem L2 apresentou GM 8.6. Na geração *off-season*, o ciclo das linhagens se inverteu, apresentando a linhagem L4 um ciclo, em dias, superior ao da linhagem L2, em que elas demoraram, respectivamente, 137 e 135 dias para atingirem R8. Esses dados corroboram os resultados obtidos por Hartwig e Kiihl (1979), que afirmaram que as cultivares de soja são altamente sensíveis a mudanças de latitude ou a épocas de semeadura devido às suas respostas nas variações do fotoperíodo.

TABELA 6 Caracterização fenotípica de linhagens de soja utilizando-se 22 descritores morfológicos, na safra de verão 2009, para os caracteres recomendados pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares, nos municípios de Cascavel-PR, Uberlândia-MG e Lucas do Rio Verde-MT

	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	Pigmentação plântula	Intensidade	Flor	Folha	Forma folha	Tamanho folha	Tipo crescimento	Altura	Hábito crescimento	Cor pubescência	Densidade pubescência	Cor vagem	Ciclo vegetativo	Ciclo total	Grupo maturidade	Transgenia	Tamanho semente	Forma semente	Brilho tegumento	Cor tegumento	Cor hilo	Peroxidase
Linhagem 1	1	-	1	7	5	7	1	5	5	3	7	4	7	7	8.8	2	7	1	5	1	4	1
Linhagem 2	2	7	2	7	5	7	1	5	5	3	7	4	7	7	8.6	2	7	1	5	1	4	1
Linhagem 3	1	-	1	7	5	7	1	5	5	3	7	4	7	7	8.4	2	7	1	5	1	4	1
Linhagem 4	2	7	2	7	5	7	1	5	5	3	7	4	7	7	8.5	2	7	1	5	1	4	1
Linhagem 5	1	-	1	5	3	3	3	7	1	1	3	1	5	4	5.7	2	3	2	3	1	3	1
Linhagem 6	2	7	2	5	4	5	1	5	5	3	5	4	5	5	8.0	2	5	2	3	1	6	2
Linhagem 7	2	5	2	5	4	5	1	3	5	1	3	4	5	5	8.0	2	5	2	5	1	5	2
Linhagem 8	2	7	2	7	3	3	3	7	1	3	7	4	7	6	8.3	2	5	2	3	1	6	2
Linhagem 9	2	5	2	5	4	5	1	5	5	3	5	4	5	5	8.1	2	7	1	7	1	4	1
Linhagem 10	2	5	2	5	3	3	3	7	1	3	5	3	5	5	7.8	2	5	2	3	1	4	1

*Numeração referente às características da TABELA 5

TABELA 7 Altura de planta, número de dias para florescimento (R1) e número de dias para maturação (R8) no ciclo de inverno para a soja, no município de Planura-MG

Linhagem	Programa de Origem	8*	13	14
		Altura (cm)	Ciclo vegetativo (dias)	Ciclo total (dias)
Linhagem 1	LRV - MT	90	63	140
Linhagem 2	LRV - MT	86	62	135
Linhagem 3	LRV - MT	79	60	135
Linhagem 4	LRV - MT	84	60	137
Linhagem 5	Cascavel-PR	71	46	95
Linhagem 6	Uberlândia-MG	75	41	95
Linhagem 7	Uberlândia-MG	69	57	127
Linhagem 8	Uberlândia-MG	89	59	130
Linhagem 9	Uberlândia-MG	87	58	127
Linhagem 10	Uberlândia-MG	98	56	119

*numeração referente às características da TABELA 5

Para as características qualitativas avaliadas, não houve alteração quando comparados os resultados obtidos nas gerações de verão e inverno (*off-season*).

Na avaliação de detecção dos *off-type* fenotípicos foram desconsiderados os caracteres de herança simples, como cor de flor e cor de pubescência. As plantas detectadas com características de herança simples distintas às descritas para a linhagem foram descartadas nos *roguings* realizados durante o desenvolvimento da cultura e não foram quantificados para fins de caracterização genotípica.

Segundo a Allard (1971), as características mais influenciáveis pelo ambiente são características controladas por muitos genes. Visto isso, as plantas *off-type* fenotípicas consideradas para a validação via análise genotípica no atual estudo foram plantas que diferiram do padrão fenotípico da linhagem para características complexas, com alto grau de interação com o ambiente. O número de *off-type* fenotípicos identificados a campo variou entre as linhagens em estudo, conforme mostra a TABELA 8.

TABELA 8 Número de *off-type* fenotípicos encontrados no campo de produção, na geração de inverno do ano de 2010, no município de Planura-MG

Linhagem	Programa de Origem	Número de <i>off-type</i> fenotípicos
Linhagem 1	LRV - MT	9
Linhagem 2	LRV - MT	9
Linhagem 3	LRV - MT	10
Linhagem 4	LRV - MT	8
Linhagem 5	Cascavel-PR	10
Linhagem 6	Uberlândia-MG	14
Linhagem 7	Uberlândia-MG	22
Linhagem 8	Uberlândia-MG	17
Linhagem 9	Uberlândia-MG	11
Linhagem 10	Uberlândia-MG	13

As dez plantas consideradas padrão para cada linhagem foram selecionadas considerando-se todos os caracteres morfológicos da cultura. As plantas *off-type* fenotípicos foram identificadas por meio de caminharmento pelo campo de produção entre os estádios R6 e R7 para cada linhagem. As plantas foram coletadas e etiquetadas individualmente para debulha e envio ao laboratório, para a realização da análise genotípica.

Na TABELA 9 estão apresentados os resultados genotípicos da análise com base em marcadores moleculares SNP's, para as dez linhagens em estudo. De forma a permitir a comparação dos resultados fenotípicos e genotípicos, foi adicionada à TABELA 9 uma coluna contendo os resultados das análises fenotípicas. O dado genotípico para o padrão da linhagem, obtido a partir da genotipagem das dez plantas com perfil padrão coletadas a campo, encontra-se na primeira linha para cada linhagem. As demais linhas dentro de cada linhagem referem-se aos dados das plantas consideradas fenotipicamente distintas do padrão.

TABELA 9 Resultados das análises genotípicas via marcadores moleculares SNP, utilizando-se 20 SNP assays, para a distinção entre *off-type* fenotípicos e *off-type* genotípicos, em soja.

Linhagem	Programa que desenvolveu a linhagem	Tipo de planta considerado via análise fenotípica	Resultado genotípico	Grupos de ligação																			
				F	A1	B2	C2	D1B	E	L	O	D1	D	A2	B1	C1	G	H	I	J	K	M	N
												A	2										
				SNP assays																			
				SNP001	SNP002	SNP003	SNP004	SNP005	SNP006	SNP007	SNP008	SNP009	SNP010	SNP011	SNP012	SNP013	SNP014	SNP015	SNP016	SNP017	SNP018	SNP019	SNP020
Linhagem 1	Centro-Oeste	Padrão	Padrão	G	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	A	G	G	A	G	A	I	A
Linhagem 1	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	G	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	A	G	G	A	G	A	I	A
Linhagem 1	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	G	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	-	G	G	A	G	-	I	A
Linhagem 1	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	G	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	A	G	G	A	G	A	I	A
Linhagem 1	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	G	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	A	G	G	A	G	A	I	A
Linhagem 1	Centro-Oeste	Off-type	Off-type	G	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	A	G	G	A/G	G	A	I	A
Linhagem 1	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	G	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	A	G	G	A	G	A	I	A
Linhagem 1	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	G	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	A	G	G	A	G	A	I	A
Linhagem 1	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	G	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	A	G	G	A	G	A	I	A
Linhagem 1	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	G	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	A	G	G	A	G	A	I	A
Linhagem 2	Centro-Oeste	Padrão	Padrão	A	T	T	C	T	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 2	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	A	T	T	C	T	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 2	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	A	T	T	C	T	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G

Linhagem 2	Centro-Oeste	Off-type	Off-type	A	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 2	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	A	T	T	C	T	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	-	A	I	G
Linhagem 2	Centro-Oeste	Off-type	Off-type	A	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 2	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	A	T	T	C	T	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 2	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	A	T	T	C	T	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 2	Centro-Oeste	Off-type	Off-type	A	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 2	Centro-Oeste	Off-type	Off-type	A	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 3	Centro-Oeste	Padrão	Padrão	G	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	A	G	G	A	G	A	I	A
Linhagem 3	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	G	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	A	G	G	A	G	A	I	A
Linhagem 3	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	G	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	A	G	G	A	G	A	I	A
Linhagem 3	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	G	T	T	C	T	C	A	T	C	A	-	C	A	G	G	A	G	A	I	A
Linhagem 3	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	G	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	A	G	G	A	G	A	I	A
Linhagem 3	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	G	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	A	G	G	A	G	A	I	A
Linhagem 3	Centro-Oeste	Off-type	Off-type	A/G	T	A/I	C	T	C	A	T	C	A	D	C	A/I	G	G	A	G	A	I	A
Linhagem 3	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	G	T	T	C	T	C	A	T	C	A	D	C	A	G	G	A	G	A	I	A
Linhagem 3	Centro-Oeste	Off-type	Off-type	A/G	A/I	A/I	C	T	C/T	A	T	C	A	D/I	C	A/I	G	C/G	A	G	A	I	A/G
Linhagem 3	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
Linhagem 4	Centro-Oeste	Padrão	Padrão	A	T	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 4	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	A	T	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 4	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linhagem 4	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	A	T	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G

Linhagem 4	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	A	T	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 4	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	A	T	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 4	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	A	T	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 4	Centro-Oeste	Off-type	Padrão	A	T	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 4	Centro-Oeste	Off-type	Off-type	A	A	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 5	Sul	Padrão	Padrão	G	A	A	C	T	T	A	A	C	A	I	C	T	A	G	G	A	A	D	G
Linhagem 5	Sul	Off-type	Padrão	G	A	A	C	T	T	A	A	C	A	I	C	T	A	G	G	A	A	D	G
Linhagem 5	Sul	Off-type	Padrão	G	A	A	C	T	T	A	A	C	A	I	C	T	A	G	G	A	A	D	G
Linhagem 5	Sul	Off-type	Padrão	G	A	A	C	T	T	A	A	C	A	I	C	T	A	G	G	A	A	D	G
Linhagem 5	Sul	Off-type	Off-type	G	A/I	A	C	T	T	A	A/I	C	A/G	I	C	T	A	G	G	A	A	D	G
Linhagem 5	Sul	Off-type	Padrão	G	A	A	C	T	T	A	A	C	A	I	C	T	A	G	G	A	A	D	G
Linhagem 5	Sul	Off-type	Padrão	G	A	A	C	T	T	A	A	C	A	I	C	T	A	G	G	A	A	D	G
Linhagem 5	Sul	Off-type	Padrão	G	A	A	C	T	T	A	A	C	A	I	C	T	A	G	G	A	A	D	G
Linhagem 5	Sul	Off-type	Padrão	G	A	A	C	T	T	A	A	C	A	I	C	T	A	G	G	A	A	D	G
Linhagem 5	Sul	Off-type	Padrão	G	A	A	C	T	T	A	A	C	A	I	C	T	A	G	G	A	A	D	G
Linhagem 6	Centro	Padrão	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	T	C	A	I	C	T	G	G	G	G	A	D	A
Linhagem 6	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	T	C	A	I	C	T	G	G	G	G	A	D	A
Linhagem 6	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	T	C	A	I	C	T	G	G	-	G	A	D	A
Linhagem 6	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	T	C	A	I	C	T	G	G	G	G	A	D	A
Linhagem 6	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	T	C	A	I	C	T	G	G	G	G	A	D	A
Linhagem 6	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	T	C	A	I	C	T	G	G	G	G	A	D	A
Linhagem 6	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	T	C	A	I	C	T	G	G	G	G	A	D	A

Linhagem 6	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	T	C	A	I	C	T	G	G	G	G	-	D	A
Linhagem 6	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	T	C	A	I	C	T	G	G	G	G	A	D	A
Linhagem 6	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	T	C	A	I	C	T	G	G	G	G	A	D	A
Linhagem 6	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	T	C	A	I	C	T	G	G	G	G	A	D	A
Linhagem 6	Centro	Off-type	Off-type	G	T	T	C	A	C	G	T	C	A	D	C	T	G	G	G	G	A	D	A
Linhagem 6	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	T	C	A	I	C	T	G	G	G	G	A	D	A
Linhagem 6	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	T	C	A	I	C	T	G	G	G	G	A	D	A
Linhagem 6	Centro	Off-type	Off-type	G	A/T	T	C	A/T	C	G	A/T	C	A	D/I	C	T	G	G	G	G	A	D	G
Linhagem 7	Centro	Padrão	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Off-type	G	T	A	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Off-type	A/G	T	A/T	C	A/T	-	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Off-type	G	T	A	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Padrão	G	T	A	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Off-type	-	T	A/T	C	T	T	G	A/T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Padrão	G	-	T	C	A	-	-	-	-	A	-	C	T	G	-	-	-	-	-	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Off-type	G	T	A	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	A/G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G

Linhagem 7	Centro	type Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Off-type	G	T	A	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Off-type	G	T	A	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	-	A	G	A	I	G
Linhagem 7	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	C	G	A	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	I	G
Linhagem 8	Centro	Padrão	Padrão	G	A	T	C	A	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	D	G
Linhagem 8	Centro	Off-type	Padrão	G	A	T	C	A	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	D	G
Linhagem 8	Centro	Off-type	Off-type	G	A	A	C	A	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	D	G
Linhagem 8	Centro	Off-type	Padrão	G	A	T	C	A	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	D	G
Linhagem 8	Centro	Off-type	Padrão	G	A	T	C	A	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	D	G
Linhagem 8	Centro	Off-type	Padrão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Linhagem 8	Centro	Off-type	Padrão	G	A	T	C	A	C	A	T	-	A	I	C	T	G	G	A	G	A	D	G
Linhagem 8	Centro	Off-type	Padrão	G	A	T	C	A	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	D	G
Linhagem 8	Centro	Off-type	Off-type	G	A	A	C	A	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	D	G
Linhagem 8	Centro	Off-type	Padrão	G	A	T	C	A	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	D	G
Linhagem 8	Centro	Off-type	Padrão	G	A	T	C	A	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	D	G
Linhagem 8	Centro	Off-type	Padrão	G	A	T	C	A	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	D	G
Linhagem 8	Centro	Off-type	Padrão	G	A	T	C	A	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	D	G
Linhagem 8	Centro	Off-type	Padrão	G	A	T	C	A	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	D	G
Linhagem 8	Centro	Off-type	Padrão	G	A	T	C	A	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	D	G

Linhagem 8	Centro	Off-type	Off-type	G	A	A	C	A	C	A	T	C	A	D/I	C	T	G	G	A	G	A	D	G
Linhagem 8	Centro	Off-type	Off-type	G	A	T	C	A	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	D	A/G
Linhagem 8	Centro	Off-type	Padrão	G	A	T	C	A	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	D	G
Linhagem 8	Centro	Off-type	Off-type	G	A	A/T	C	A	C	A	T	C	A	I	C	T	G	G	A	G	A	D	G
Linhagem 9	Centro	Padrão	Padrão	G	T	T	C	A	T	G	A	C	A	I	C	A	G	C	G	G	A	D	G
Linhagem 9	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	T	G	A	C	A	I	C	A	G	C	G	G	A	D	G
Linhagem 9	Centro	Off-type	Off-type	G	T	T	C	A	T	G	A	C	A	D/I	C	A	G	C	G	G	A	D	G
Linhagem 9	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	T	G	A	C	A	I	C	A	G	C	G	G	A	D	G
Linhagem 9	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	T	G	A	C	A	I	C	A	G	C	G	G	A	D	G
Linhagem 9	Centro	Off-type	Off-type	G	T	T	C	A	T	G	A	C	A	I	C	T	G	C	G	G	A	D	G
Linhagem 9	Centro	Off-type	Off-type	G	T	T	C	A	T	G	A	C	A	I	C	T	G	C	G	G	A	D	G
Linhagem 9	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	T	G	A	C	A	I	C	A	G	C	G	G	A	D	G
Linhagem 9	Centro	Off-type	Off-type	G	T	T	C	A	T	G	A	C	A	D/I	C	A	G	C	G	G	A	D	G
Linhagem 9	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	T	G	A	C	A	I	C	A	G	C	G	G	A	D	G
Linhagem 9	Centro	Off-type	Off-type	G	T	T	C	A	T	G	A	C	A	I	C	T	G	C	G	G	A	D	G
Linhagem 9	Centro	Off-type	Padrão	G	T	T	C	A	T	G	A	C	A	I	C	A	G	C	G	G	A	D	G
Linhagem 10	Centro	Padrão	Padrão	A	A	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 10	Centro	Padrão	Off-type	A	A/I	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 10	Centro	Off-type	Padrão	A	A	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 10	Centro	Off-type	Padrão	A	A	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 10	Centro	Off-type	Off-type	A	T	A	C	T	T	A	T	C	A	D/I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 10	Centro	Off-type	Padrão	A	A	-	C	T	T	A	T	-	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 10	Centro	Off-type	Padrão	A	A	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G

Linhagem 10	Centro	Off-type	Off-type	A	T	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 10	Centro	Off-type	Off-type	A	A/I	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 10	Centro	Off-type	Padrão	A	A	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 10	Centro	Off-type	Off-type	A	T	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 10	Centro	Off-type	Off-type	A	T	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 10	Centro	Off-type	Padrão	A	A	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G
Linhagem 10	Centro	Off-type	Padrão	A	A	A	C	T	T	A	T	C	A	I	C	T	G	C	A	G	A	I	G

onde: A = adenina; C = citosina; T = timina; G = guanina; D = deleção; I = Inserção

A partir da confirmação dos *off-type* que realmente se distinguiram genotipicamente, via análise genética, na amostra de plantas consideradas fenotipicamente distintas, foi calculado o número médio esperado de *off-type* genotípicos. Esse valor médio é o índice esperado de *off-type* verdadeiros (geneticamente distintos do padrão), a partir de detecções de *off-type* fenotípicos a campo, considerando-se características de herança genética complexa, como ciclo.

TABELA 10 Número de *off-type* fenotípicos, número de *off-type* genotípicos e número de falso positivos por meio da análise dos dados via estatística não-paramétrica, pelo cálculo do intervalo de confiança, ao nível de 95%.

	Número de plantas	Valor percentual	Intervalo de Confiança (95%)		Resultado Análise DNA
<i>Off-type</i> fenotípicos*	123	100%			
<i>Off-type</i> genotípicos	34	27,64%	19,70%	35,50%	confirmadas
Falso Positivos	89	72,36%			desconsideradas

*Plantas consideradas fenotipicamente distintas à população padrão por meio da avaliação dos caracteres morfológicos.

O número de *off-type* fenotípicos confirmados como geneticamente distintos à população padrão foi, na média para todas as linhagens estudadas, de 27,64%, com uma probabilidade de 95% e um intervalo de confiança entre 19,70% a 35,50%. Ou seja, para cada 100 plantas consideradas fenotipicamente distintas do padrão das linhagens, estatisticamente, para a população avaliada e para os vinte marcadores SNP utilizados, aproximadamente 28 plantas foram confirmadas como genotipicamente diferentes do padrão, com um intervalo de confiança entre 20 e 36 plantas. A TABELA 11 apresenta uma simulação para diferentes populações de plantas avaliadas como *off-type* fenotípicos e as frequências esperadas de *off-type* genotípicos.

TABELA 11 Simulação da frequência esperada de indivíduos genotipicamente distintos em diferentes populações de *off-type* fenotípicos

Número de <i>off-type</i> fenotípicos observados	Número de <i>off-type</i> genotípicos esperados	Intervalo de confiança (95%)	
10	3	2	4
20	6	4	7
30	8	6	11
40	11	8	14
50	14	10	18
70	19	14	25
90	25	18	32
100	28	20	36

A linhagem L1 apresentou no campo de produção nove plantas consideradas fora do padrão descrito. As plantas encontradas na linhagem L1 diferiram do padrão das demais plantas da lavoura principalmente em relação ao ciclo final. As plantas *off-type* encontravam-se mais verdes do que o padrão da lavoura, como se pode ver na FIGURA 14.

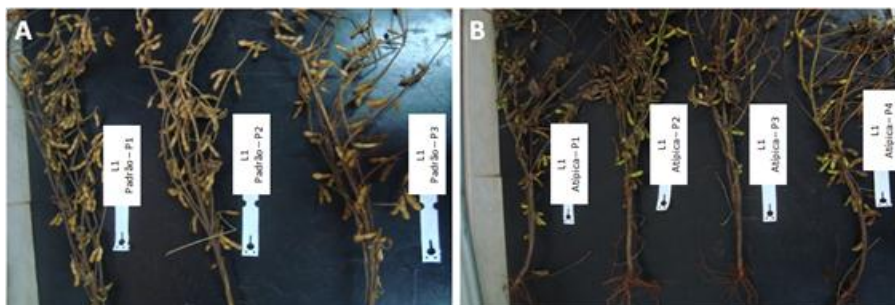


FIGURA 14 Plantas com fenótipo padrão (A) e plantas com fenótipo *off-type* (B) para a Linhagem 1.

As plantas *off-type*, consideradas mais tardias do que o padrão no momento da coleta apresentaram tonalidade de hilo de coloração mais clara, conforme ilustra a FIGURA 15.

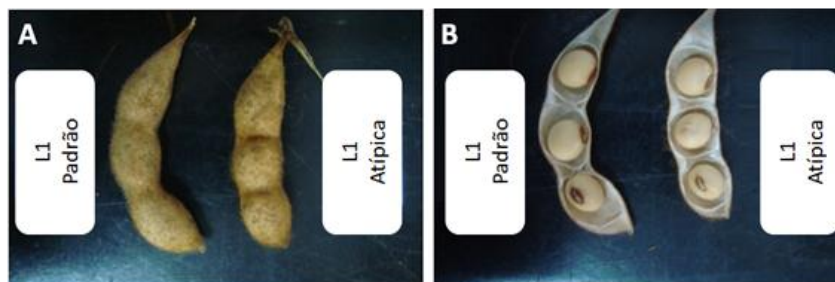


FIGURA 15 Tonalidade de vagem e pubescência (A) e coloração de hilo (B) de planta fenótipo padrão e planta fenótipo *off-type* da Linhagem 1

Por meio da análise genotípica das nove plantas consideradas *off-type* fenotípicos, apenas uma das plantas foi considerada genotipicamente diferente, na análise para os vinte marcadores SNP. Essa análise mostra que o erro de detecção, utilizando-se apenas os caracteres morfológicos, para distinção de *off-type*, analisando-se características de herança poligênica foi de 88,89% para a linhagem L1, conforme TABELA 12.

TABELA 12 Número de plantas fenotipicamente distintas, número de plantas genotipicamente distintas, plantas genotipicamente idênticas ao padrão e percentual de erro da análise fenotípica para a Linhagem 1, coletada em Planura-MG.

Linhagem	Plantas fenotipicamente distintas	Plantas genotipicamente distintas	Plantas genotipicamente idênticas ao padrão	Percentual de erro análise na fenotípica
Linhagem 1	9	1	8	88,89%

Para a linhagem L2, foram encontradas no campo de produção nove plantas consideradas fenotipicamente distintas do padrão. A característica que permitiu a identificação fenotípica dos *off-type* para a linhagem L2 foi o ciclo, no qual as plantas atípicas apresentaram ciclo mais tardio do que o fenótipo do padrão, conforme FIGURA 16.

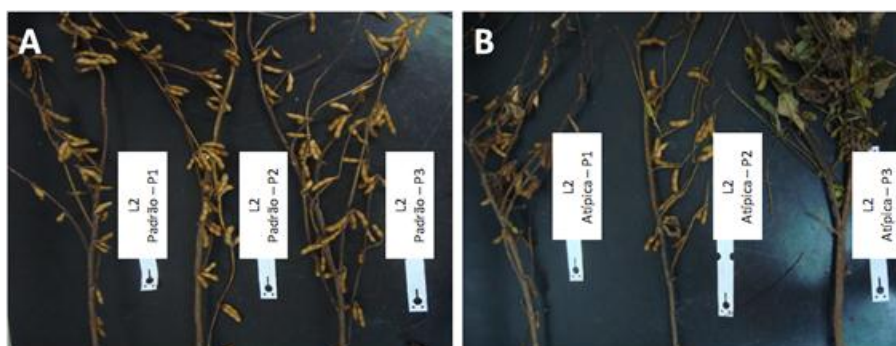


FIGURA 16 Plantas com fenótipo padrão (A) e plantas com fenótipo *off-type* (B) para a linhagem L2.

Na FIGURA 16 B estão apresentadas três plantas consideradas *off-type* fenotípicos no campo de produção da linhagem L2. De acordo com o resultado de genotipagem via marcador molecular, para os vinte SNP assays utilizados, das três plantas na figura, apenas a planta com identificação “L2 Atípica – P2” foi considerada como atípica genotipicamente para o padrão genético da linhagem. As demais foram consideradas genotipicamente idênticas ao padrão, para os vinte SNP assays utilizados na análise.

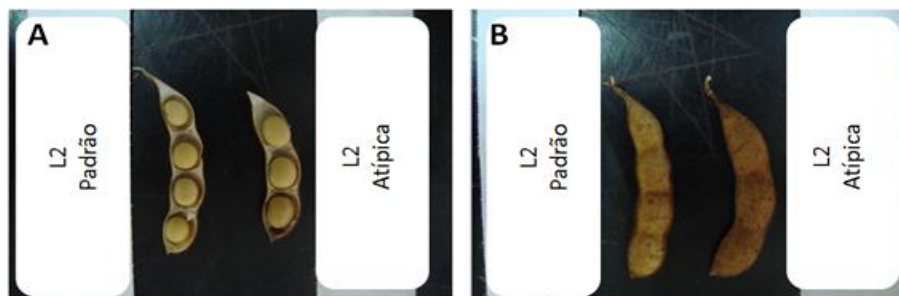


FIGURA 17 Coloração de tegumento (A) e tonalidade de vagem e pubescência (B) de planta fenótipo padrão e planta fenótipo *off-type* da Linhagem 2.

A FIGURA 17 A apresenta a coloração do tegumento das sementes das plantas perfil padrão e atípico para a linhagem L2. Nota-se a coloração esverdeada do tegumento das sementes das plantas *off-type*.

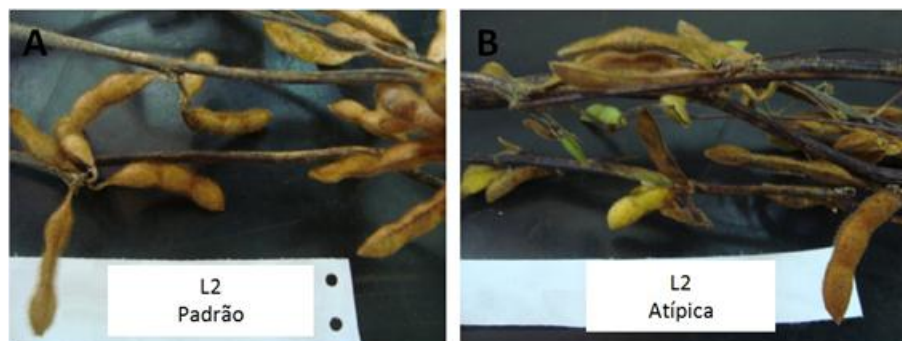


FIGURA 18 Detalhe de vagem da planta padrão (A) e detalhe da vagem do tipo de planta *off-type* (B) para a Linhagem 2.

Os resultados obtidos pela análise de genotipagem afirmam que para as nove plantas consideradas atípicas fenotipicamente por meio da análise visual a campo, apenas quatro se diferem do padrão genético da linhagem L2.

A TABELA 13 apresenta o erro de detecção na identificação de *off-type* fenotípicos na linhagem L2, utilizando-se apenas dados morfológicos, para características poligênicas.

TABELA 13 Número de plantas fenotipicamente distintas, número de plantas genotipicamente distintas, plantas genotipicamente idênticas ao padrão e percentual de erro da análise fenotípica para a Linhagem 2, coletada em Planura-MG

Linhagem	Plantas fenotipicamente distintas	Plantas genotipicamente distintas	Plantas genotipicamente idênticas ao padrão	Percentual de erro análise na fenotípica
Linhagem 2	9	4	5	55,56%

As linhagens L3, L4 e L6 apresentaram o mesmo perfil de plantas atípicas no campo de produção do que as linhagens L1 e L2, ou seja, plantas com ciclo atipicamente mais tardio do que o padrão, como pode ser visualizado nas figuras 19, 20 e 21.

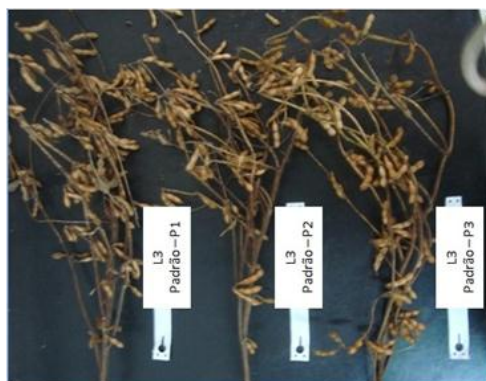


FIGURA 19 Plantas com perfil fenotípico padrão para a Linhagem 3.

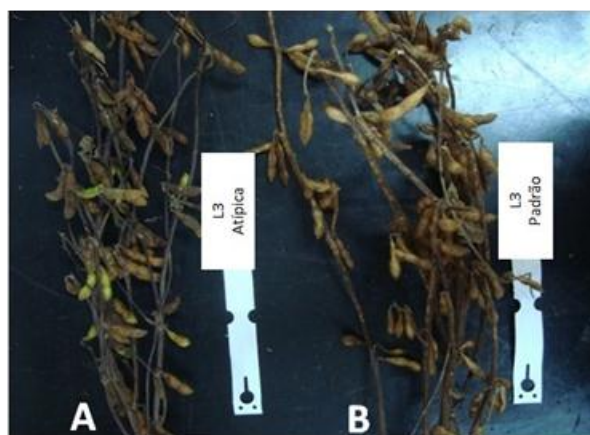


FIGURA 20 Comparação entre planta com fenótipo atípico (A) e planta com fenótipo padrão para a Linhagem 3.

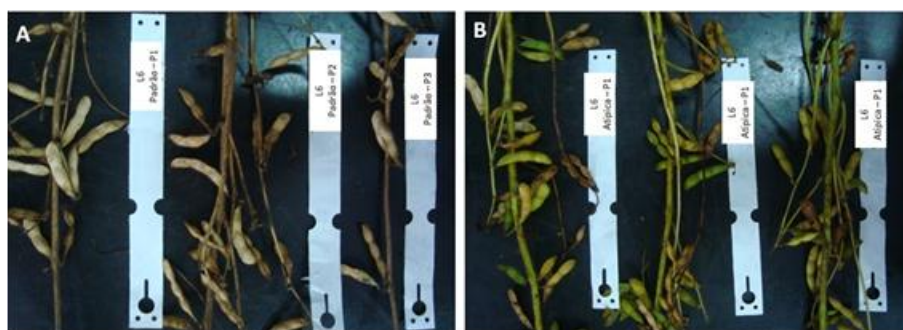


FIGURA 21 Comparação entre as plantas com perfil fenotípico padrão (A) e plantas com fenótipo *off-type* (B) para a Linhagem 6.

O resultado da análise genotípica para as linhagens L3, L4 e L6 mostra que, respectivamente, apenas 20%, 12,5% e 14,29% dos *off-type* fenotípicos identificados a campo foram genotipicamente diferentes, para os vinte marcadores avaliados na genotipagem para esses materiais, conforme ilustrado na TABELA 14.

TABELA 14 Número de plantas fenotipicamente distintas, número de plantas genotipicamente distintas, plantas genotipicamente idênticas ao padrão e percentual de erro da análise fenotípica para as linhagem L3, L4 e L6, coletadas em Planura-MG.

Linhagem	Plantas fenotipicamente distintas	Plantas genotipicamente distintas	Plantas genotipicamente idênticas ao padrão	Percentual de erro análise na fenotípica
Linhagem 3	10	2	8	80,00%
Linhagem 4	8	1	7	87,50%
Linhagem 6	14	2	12	85,71%

A linhagem L5, único genótipo oriundo do programa de melhoramento genético de soja da Syngenta situado no sul do Brasil, apresentou dez plantas morfologicamente distintas do padrão. As plantas atípicas apresentaram uma maior retenção foliar do que o perfil fenotípico padrão para o campo de produção e ainda vagens verdes e secas na mesma planta, descaracterizando-as com relação às demais, conforme FIGURA 22.



FIGURA 22 Planta com perfil fenotípico padrão (A) e planta *off-type* (B) para a Linhagem 5.

Segundo os dados obtidos por meio da caracterização genética da linhagem L5 e de seus respectivos *off-type*, apenas 10% das plantas consideradas fenotipicamente distintas com relação ao padrão do genótipo foram confirmadas pela ferramenta molecular.

TABELA 15 Número de plantas fenotipicamente distintas, número de plantas genotipicamente distintas, plantas genotipicamente idênticas ao padrão e percentual de erro da análise fenotípica para a Linhagem 5, coletada em Planura-MG

Linhagem	Plantas fenotipicamente distintas	Plantas genotipicamente distintas	Plantas genotipicamente idênticas ao padrão	Percentual de erro análise na fenotípica
Linhagem 5	10	1	9	90,00%

Os genótipos L8, L9 e L10 apresentaram *off-type* com características morfológicas semelhantes. Esse grupo de linhagens apresentou nos respectivos campos de produção plantas atípicas com diferença fenológica quanto ao ciclo e ao porte, apresentando *off-type* com plantas mais altas e mais tardias.

A linhagem L8 apresentou, segundo a caracterização via marcadores morfológicos, dezessete plantas fora do padrão descrito para o material, segundo os caracteres recomendados pelo SNPC, utilizados na avaliação. Das plantas consideradas fora de tipo, apenas 29,41% foram confirmadas como fora de padrão por meio do uso de marcadores moleculares SNP.

A linhagem L9 apresentou fenotipicamente um número de onze plantas atípicas. A linhagem L10 apresentou um número de treze *off-type* morfológicos. Após a caracterização via marcador genético, foram confirmadas como geneticamente distintas do grupo padrão das linhagens, respectivamente cinco e seis plantas, ou seja, um valor percentual de erro via caracterização fenotípica de 54,55% para a linhagem L9 e de 53,85% para a linhagem L10.

TABELA 16 Número de plantas fenotipicamente distintas, número de plantas genotipicamente distintas, plantas genotipicamente idênticas ao padrão e percentual de erro da análise fenotípica para as linhagem L8, L9 e L10, coletadas em Planura-MG.

Linhagem	Plantas fenotipicamente distintas	Plantas genotipicamente distintas	Plantas genotipicamente idênticas ao padrão	Percentual de erro análise na fenotípica
Linhagem 8	17	5	12	70,59%
Linhagem 9	11	5	6	54,55%
Linhagem 10	13	6	7	53,85%



FIGURA 23 Plantas com perfil fenotípico padrão (A) para a Linhagem 9 e plantas caracterizadas como fenotipicamente fora de tipo para os caracteres descritos para a linhagem.

O genótipo que apresentou o maior número de plantas fora de tipo segundo a detecção via marcadores morfológicos foi a linhagem L7. Foram detectadas 22 plantas consideradas fora de tipo para o padrão da linhagem. Esse material foi o único entre os dez estudados que apresentou dois tipos distintos de plantas fora de tipo. Um primeiro grupo de plantas atípicas apresentou plantas com ciclo pouco mais tardio do que as plantas padrão para a linhagem.

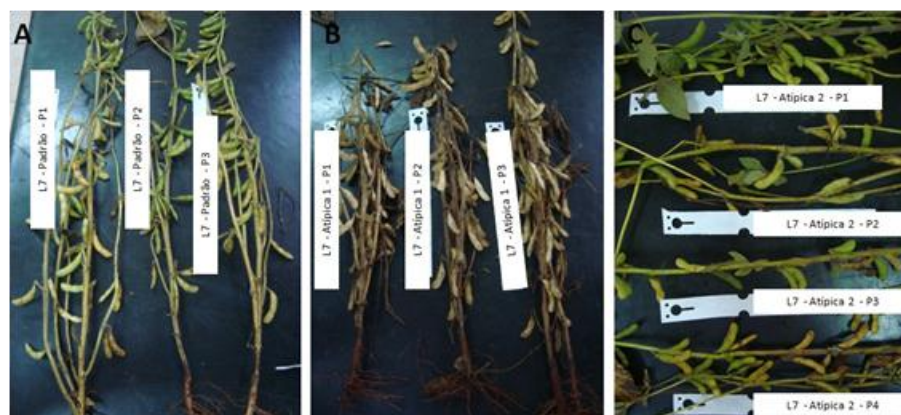


FIGURA 24 Diferentes fenótipos encontrados no campo de produção da Linhagem 7. Plantas com perfil fenotípico padrão (A), plantas com fenótipo atípico mais precoce (B) e plantas com fenótipo atípico mais tardio (C).

Um segundo grupo de *off-type* apresentou plantas com ciclo mais precoce, com diferença de maturação de até quinze dias quando comparado ao genótipo padrão. Avaliando-se individualmente os *off-type* desse grupo, percebeu-se que estas plantas não tiveram o enchimento dos grãos completado em 100% das vagens ao longo da planta, conforme ilustra a FIGURA 25.

TABELA 17 Número de plantas fenotipicamente distintas, número de plantas genotipicamente distintas, plantas genotipicamente idênticas ao padrão e percentual de erro da análise fenotípica para a Linhagem 7, coletada em Planura-MG.

Linhagem	Plantas fenotipicamente distintas	Plantas genotipicamente distintas	Plantas genotipicamente idênticas ao padrão	Percentual de erro análise na fenotípica
Linhagem 7	22	7	15	68,18%

Após realização de uma análise fitopatológica, foi identificada nas plantas consideradas atípicas a presença do fungo fitopatogênico *Macrophomina phaseolina*, conforme ilustra a FIGURA 26. O fungo *Macrophomina phaseolina* é o patógeno causador da podridão preta das raízes (KIMATI *et al.*, 1997).



FIGURA 25 Vagens oriundas de uma mesma planta atípica de ciclo mais precoce dentro da Linhagem 7, com sementes em diferentes estádios de enchimento de grãos.



FIGURA 26 Presença de microescleródios do fungo *Macrophomina phaseolina* em plantas atípicas de ciclo mais curto da Linhagem 7.

A podridão preta das raízes tem tido seu nível de importância elevado nos últimos anos, haja vista que as áreas com problemas têm aumentado em virtude de áreas de plantio com camada sub-superficial compactada, muitas vezes em virtude de um manejo do sistema plantio direto mal conduzido, o que prejudica o desenvolvimento do sistema radicular das plantas, fazendo com que fiquem mais suscetíveis à incidência do patógeno (KIMATI *et al.*, 1997). Tal patógeno tem grande importância no sistema de produção de grãos, por causar a morte prematura das plantas, prejudicando o enchimento de grãos. No sistema de produção de sementes, sua importância é ainda mais relevante, porque a caracterização da variedade em estudo é prejudicada pela morte da planta, descaracterizando-a. No entanto, apesar da morte prematura das plantas, a constituição genética das plantas não é alterada.

Os *off-type* fenotípicos ocasionados pela morte prematura das plantas na linhagem L7 produziram sementes com diferenças fenotípicas em várias características, como hilo, tegumento e formato. A FIGURA 27 apresenta sementes oriundas de uma mesma planta. As sementes marcadas com as letras A, B e C apresentam hilos com colorações diferentes. Os três hilos podem ser caracterizados, respectivamente, com as cores marrom, preto com halo ferruginoso e preto imperfeito. As sementes identificadas com as letras D e E apresentam cores de tegumento distintas. A semente D apresenta tegumento de cor creme e a semente E apresenta tegumento amarelo. Já as sementes F e G apresentam formatos diferentes. A semente marcada com a letra F apresenta formato oblongo e a semente com a letra G formato arredondado. Uma das análises realizadas pelos laboratórios de análises de sementes para a determinação da pureza varietal de um lote de sementes de soja é a análise de “outras cultivares” (BRASIL, 2009). Essa análise é baseada na coloração, no brilho, no tamanho e forma da semente e na coloração e formato do hilo. Trata-se de uma análise comparativa, em que a amostra é comparada a um padrão ou é realizada uma averiguação dentro da própria amostra.



FIGURA 27 Variações na coloração do hilo, tegumento e formato de sementes oriundas de uma mesma planta atípica da Linhagem 7, morta precocemente pelo fungo *Macrophomina phaseolina*, causador da podridão preta da raiz.

Como ocorrido com a linhagem L7, vários lotes de sementes com alto padrão genético podem ser tidos como impuros ou contaminados, quando, na verdade, a diferença apresentada na amostra constitui apenas uma variação fenotípica, provocada por algum estresse biótico ou abiótico. Dados semelhantes foram apresentados por Rabel *et al.* (2010), que utilizaram descritores morfológicos e marcadores moleculares microssatélites na determinação da pureza genética em lotes de sementes e afirmaram que apenas descritores morfológicos, como cor de hilo, nos testes de pureza genética de sementes de soja não são confiáveis, levando à aprovação ou à condenação errônea de lotes de sementes. Rossini *et al.* (1995) observaram, em seu estudo com 26 cultivares de soja, que o hilo pode variar entre diferentes cultivares e dentro de uma mesma cultivar, podendo uma cultivar de hilo de cor marrom apresentar ao mesmo tempo hilo de cor amarela e hilo de cor marrom avermelhado.

Com a crescente demanda do mercado por sementes fiscalizadas, com alta qualidade genética e fisiológica, as empresas têm buscado alternativas no processo de produção de sementes fora do período usual de produção e em diferentes ambientes. Estados como o Tocantins, até há poucos anos não tinham tradição no processo de produção de sementes de soja, têm utilizado como alternativa para a produção de sementes no período até então considerado entressafra no eixo Sul/Centro/Centro-Oeste do País, como nos meses de maio a setembro. Tais alternativas permitem o incremento do volume de sementes disponíveis ao mercado. No entanto, algumas características morfológicas, como formato das sementes, tonalidade da cor do hilo e do tegumento, podem ser afetadas pelo fator ambiental. Esses dados estão em concordância

com os resultados obtidos por Moreira e outros (1999), que verificaram variações nas cores de hilo das cultivares BRS Carla e BRS Celeste, em regiões onde ocorreram veranicos e altas temperaturas durante a formação das sementes. Além dos caracteres morfológicos das sementes, plantios *off-season* podem afetar os caracteres relacionados às plantas, como altura, ciclos vegetativo e reprodutivo, entre outros.

Em 2004, Schuster *et al.* avaliaram 21 lotes de sementes enviadas por produtores de sementes, cuja origem eram sementes reprovadas no processo de certificação. Foram realizadas avaliações com base nos caracteres morfológicos das sementes e detectadas as sementes atípicas. Por meio de marcadores microssatélites, foi possível detectar que treze dos 21 lotes apresentavam índice de contaminação genética acima do limite tolerado. Para os demais, em três lotes as sementes consideradas atípicas eram genotipicamente idênticas ao padrão.

Os resultados obtidos por Salgado (2001), trabalhando com marcadores morfológicos e moleculares na certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho e por Padilha (2002), trabalhando com marcadores moleculares na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical, estão em consonância com os resultados obtidos no presente trabalho, pois suportam o uso de marcadores moleculares como uma ferramenta precisa e eficiente no processo de produção de sementes para a comprovação de plantas atípicas de origem genética.

Avaliando a eficiência dos descritores morfológicos na caracterização de cultivares de arroz, Bonow (2007), trabalhando em ambientes de casa de vegetação e área de produção de sementes, afirmou que os descritores morfológicos são úteis, mas não suficientes para a caracterização e a diferenciação de cultivares de arroz.

Também Silva (2006), estudando a caracterização morfológica e molecular de acessos de melancia, evidenciou o maior poder discriminante dos marcadores moleculares e o atribuiu à possibilidade de maior cobertura do genoma, ao contrário dos marcadores morfológicos que ocorrem em menor número.

Entre os caracteres morfológicos utilizados para descrição de cultivares em soja, mesmo os mais estáveis podem sofrer influência ambiental, maximizando a possibilidade de erro nas avaliações e validações. A FIGURA 28 mostra uma planta de soja apresentando três tipos diferentes de pubescência dentro da mesma planta. Ocorrências dessa natureza podem induzir a erros e os testes de DNA podem assegurar que decisões possam ser tomadas baseadas em fatores genéticos, evitando-se decisões baseadas em caracteres que possam estar expressos de forma distinta unicamente em função do ambiente a que foi exposto.



FIGURA 28 Soja com diferentes tonalidades de pubescência dentro da mesma planta (A); terço superior da planta com pubescência marrom clara/cinza (B); terço médio da planta com pubescência marrom intermediária (C); terço inferior da planta, com pubescência marrom escura (D); e vagens dos diferentes terços da planta, com diferentes tonalidades de pubescência (E).

Diante do exposto, pode-se afirmar que os marcadores moleculares são ferramentas úteis no processo de produção de sementes. Sua estabilidade, independente do ambiente por serem intrínsecos ao DNA, permite que plantas ou lotes de sementes sejam avaliados isolando-se o fator ambiental. Por meio dessa ferramenta, campos de produção de sementes conduzidos em qualquer ambiente, seja na safra de verão ou *off-season*, que porventura possam ter plantas consideradas fora de padrão, ou sementes com características diferentes da descrita para a cultivar podem ter suas amostras submetidas para testes de confirmação. Tais testes podem evitar que lotes de sementes com alto padrão genético sejam descartados, possibilitando às empresas obtentoras e laboratórios de análise de sementes trabalharem com maior segurança no processo de tomada de decisão quanto à validação de lotes de sementes. Cabe ressaltar que muitas vezes as empresas não possuem *back-up* de sementes de algumas categorias, como, por exemplo, Semente Genética, haja vista as fontes e volumes produzidos em cada categoria, em que um descarte de um lote em virtude de uma análise errônea de *off-type*, seja em função do campo de produção ou do lote de sementes, pode inviabilizar o lançamento de uma cultivar.

CONCLUSÕES

Os marcadores moleculares SNP's são ferramentas eficientes e úteis no processo de distinção de *off-type* genotípicos em campos de produção de soja. São marcadores estáveis e podem ser utilizados independentemente de época e local de plantio dos campos de produção.

O uso de marcadores moleculares SNP evita a condenação de campos de produção de sementes com alta qualidade genética e presença de *off-type* fenotípicos em virtude apenas de diferença ambiental.

Os marcadores moleculares SNP podem ser úteis como ferramentas complementares no processo de fiscalização de campos de produção de sementes.

REFERÊNCIAS

- ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blüchner, 1971. 381 p.
- ALLIPRANDINI, L. F.; ABATTI, C.; BERTAGNOLLI, P. F.; CAVASSIM, J. E.; GABE, H. L.; KUREK, A.; MATSUMOTO, M. N.; OLIVEIRA, M. A. R. de; PITOL, C.; PRADO, L. C.; STECKLING, C. Understanding soybean maturity groups in Brazil: environment, cultivar classification, and stability. **Crop Science**, Madison, v. 49, n. 3, p. 801-808, 2009.
- APASSUL. Associação dos produtores e comerciantes de sementes e mudas do RS. **Padrões para produção e comercialização de sementes de soja no Brasil**. Disponível em: <http://www.apassul.com.br/arquivo/in25_novos_padroes/anexo9-soja.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2012.
- BERNARD, R.L. The inheritance of pod color in soybean. **Journal of Heredity**, Illinois, v. 58, n. 4, p. 165-169, 1967.
- BORÉM, A.; CAIXETA, T. E. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006.
- BONOW, S.; VON PINHO, E. V. de R.; SOARES, A. A. Caracterização morfológica de cultivares de arroz visando a certificação da pureza varietal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 619-627, maio/jun. 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Normas para produção, comercialização e utilização de sementes**. Brasília, DF, 2005.
- _____. **Regras para análises de sementes**. Brasília, DF: SNDA, DNDV, CLAV, 2009.
- _____. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Guia de inspeção de campos para produção de sementes**.— 3. ed. revisada e atualizada. Brasília, DF, 2011. 41 p.
- _____. **Decreto 5.153 de 23 de julho de 2004**. Aprova o Regulamento da Lei nº. 10.711, de 5 de agosto de 2003, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudas - SNSM, e dá outras providências.
- _____. Decreto-lei 9.456 de 28 de abril de 1997. Lei de proteção de cultivares. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 28 de abr. 1997. Seção 1. p. 79.
- _____. Decreto-lei 10.711 de 5 de agosto de 2003. Nova lei de Sementes e Mudas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 6 de ago. 2003. Seção 1. p. 1-4.
- BRIGGS, F. N.; KNOWLES, P. F. **Introduction to plant breeding**. New York: Reinhold Publishing, 1967.
- Bussab W. O., Morettin P. A. **Estatística básica**. 7. ed. São Paulo: Saraiva, 2011.
- CHOI, I. Y. *et al.* A soybean transcript map: gene distribution, haplotype and single nucleotide polymorphism analysis. **Genetics**, Austin, v. 176, p. 685-696, 2007.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Brasil). **Quarto levantamento de grãos - janeiro de 2012**. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_01_10_10_53_02_boletim_graos_4o_levantamento.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2012.

CONWAY, G. **Produção de alimentos no século XXI**: biotecnologia e meio ambiente. São Paulo: Estação Liberdade, 2003.

DE JONG, D. W. An investigation of the role of plant peroxidase in cell wall development by the histochemical method. **J. Histochem. Cytochem.**, Baltimore, v. 15, p. 336-346, 1967.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: State University of Science and Technology, 1977. 11 p.

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

HARTWIG, E. E.; KIIHL, R. A. S. Identification and utilization of a delayed flowering character in soybean for short day conditions. **Field Crops Research**. New York: v. 2, p. 145-51, 1979.

HYMOWITZ, T. **Germplasm collection, management, and evaluation: the subgenus Glycine**. Soybean research in China and the United States: proceedings. Urbana: University of Illinois. College of Agriculture, 1983. p.69-70.

JOHNSON, G. W.; BERNARD, R. L. Soybean genetic and breeding. In: NORMAN, A.G. **The soybean**. New York: Academic Press, 1963, p.1-73.

KAISTER, M.; FARIAS, J. R. B. Regionalização dos testes de valor de cultivo e uso e da indicação de cultivares de soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 24., 2002, São Pedro. **Resumos ...** Londrina: Embrapa Soja, 2002. p. 97-98.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.) **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1997. v. 2.

KRZYZANOWSKI, F. C.; GILIOLI, J. L.; MIRANDA, L. C. Produção de sementes nos cerrados. In: ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. de M. (Ed.). **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFÓZ, 1993. p.469.

MALUF, M. P. *et al.* Genetic diversity of cultivated Coffea arabica inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR marker systems. **Scientia Agricola**, v.62, p.366-373, July/Aug. 2005.

MILACH, S. C. K. Uso de Marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: BORÉM, A. *et al.* (Ed.). **Biossegurança, proteção de cultivares, acesso aos recursos genéticos e propriedade industrial na agropecuária**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 182 p.

MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 198.

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

NAJIMI, B. *et al.* Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v.7, n.1, p.17-35, 2003.

NOGUEIRA, A. P. O. **Análise discriminante na caracterização de novos descritores em soja [Glycine max (L.) Merrill]**. Viçosa, MG: UFV, 2007. 96p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.

ORNELLAS, L.H. **A alimentação por meio dos tempos**. 2.ed. Florianópolis: UFSC, 2000. 307p.

PADILHA, L. **Marcadores moleculares semi automatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical**. 2002. 85 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

RABEL, M.; VIEIRA, E. S. N.; LANA, U. G. P.; PAIVA, E.; SEHNEM, M. A. S.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares microssatélites na avaliação de sementes de soja com variação na coloração do hilo. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 32, n. 2, p. 19-025, 2010.

RAFALSKI, J. A. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. **Plant Science**, v. 162, n. 3, p. 329-33, 2002.

ROCHA, R. B. *et al.* O mapeamento genético no melhoramento de plantas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, [s. L.], n. 30, p.27-32, jan./jun. 2003.

ROSSINI, M. C.; IRIGON, D. L.; KRZYZANOWSKI, F. C.; VERNETI, F. de J. Caracterização de 26 cultivares de soja [Glycine max (L.) Merrill] recomendadas para a região Sul – Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 17, n. 2, p. 227-235, 1995.

SALGADO, K. C. C. **Certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho por meio de marcadores morfológicos e moleculares**. 2001. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SCHUSTER, I.; QUEIROZ, V. T.; TEIXEIRA, A. I.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Determinação da pureza varietal de sementes de soja com auxílio de marcadores moleculares microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 3, p. 247-253, 2004.

SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecenaz, 2009.

SILVA, M. L., QUEIRÓZ, M. A., FERREIRA, M. A. J. F., BUSO, G. S. C. Caracterização morfológica e molecular de acessos de melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 24, p. 405-409, 2006.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Soybean acreage report**. Disponível em <<http://usda01.library.cornell.edu/usda/current/Acre/Acre-06-30-2011.pdf>> Acesso em: 01 fev. 2012.

VERNETTI, F. J. (Coord.). **Soja: genética e melhoramento**. Campinas: Fundação Cargill, 1983. v.1.

VIEIRA, R. D. **Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de quatorze cultivares de soja (Glycine max (L.) Merrill)**. Viçosa, 1980. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1980.