



LAIS NÓBREGA RODRIGUES

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE SOJA
COM BASE EM MARCADORES MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES**

**LAVRAS – MG
2021**

LAIS NÓBREGA RODRIGUES

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE SOJA
COM BASE EM MARCADORES MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira
Orientador

**LAVRAS – MG
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Rodrigues, Lais Nóbrega.

Diversidade Genética entre Cultivares de Soja com Base em
Marcadores Morfológicos e Moleculares / Lais Nóbrega Rodrigues.
- 2021.

57 p.

Orientador(a): Welison Andrade Pereira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Glycine max. 2. Diversidade. 3. Descritores. I. Pereira,
Welison Andrade. II. Título.

LAIS NÓBREGA RODRIGUES

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE SOJA COM BASE EM
MARCADORES MORFOLÓGICOS E MOLECULARES**

**GENETIC DIVERSITY BETWEEN SOYBEAN CULTIVARS BASED ON
MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR MARKERS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de abril de 2021.

Dr. Carlos Eduardo Pulcinelli Souza Cruz S.A.
Dra. Edila Vilela de Resende Von Pinho UFLA

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira
Orientador

**LAVRAS – MG
2021**

Á Deus, responsável por toda serenidade em minha vida.

Aos meu pais, Marisa e Eraldo (in memoriam), e às minhas irmãs, Larissa e Ana Luisa, meu porto seguro.

Ao meu companheiro de vida, Lucas.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente na minha vida, por todos os desafios colocados em meu caminho pois, com eles, pude conquistar o que conquistei, com saúde e esforço.

À minha mãe, Marisa, por ter me apoiado em todos os detalhes e ter investido tanto na minha educação. Ao meu pai, Eraldo (*in memoriam*), por toda a dedicação e ensinamentos, principalmente a persistência e tranquilidade. Com meus pais, aprendi que o amor é a base de tudo.

Às minhas queridas irmãs, Larissa e Ana Luisa, que sempre se fizeram presentes, dando-me coragem e conselhos, principalmente nos momentos mais difíceis.

À minha família materna e paterna, em especial aos tios e tias que se fizeram presentes mesmo que de longe, por todo apoio, principalmente no início do mestrado.

Ao meu noivo, Lucas, por todo companheirismo, amor, paciência, compreensão e carinho, mesmo quando estava trabalhando em outro país. Com ele, tudo parece ter solução e toda dificuldade é amenizada.

À minha sogra, Ceíça, e ao meu sogro, Sales, por todo o apoio dado todos esses anos e por toda preocupação, fazendo-me sentir sempre parte da família.

Ao meu orientador, professor Welison Andrade Pereira, que foi essencial na construção deste trabalho, por toda disposição, incentivo e orientações que me foram dadas. À sua esposa, Kelly, e filha, Manuela, pelo acolhimento em momentos essenciais.

Ao professor Carlos Eduardo Pulcinelli e ao professor Cosme Damião Cruz, que pacientemente estiveram a disposição, por todos os ensinamentos passados.

À Carol, Luciana, Ana, Liliana e demais colegas do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas. Em especial, a Cleilson, Antônio e Erik, por todo apoio durante a condução do experimento.

À professora Heloísa Oliveira dos Santos e à professora Edila Vilella de Resende Von Pinho, por toda disposição e contribuição em enriquecer o presente trabalho.

Aos técnicos Rafael, Lamartine e Lilian, que se fizeram presentes nesses dois anos de mestrado, por toda disposição em ajudar.

Aos funcionários da UFLA, especialmente Otávio e Léo, por terem sido essenciais com toda a disponibilidade durante a condução do experimento em campo.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelo acolhimento e oportunidade da realização deste trabalho. A todos os professores que contribuíram agregando conhecimento e experiência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela oportunidade da bolsa de estudos.

A todos que, durante toda a minha vida, fizeram parte do meu desenvolvimento pessoal e profissional.

OBRIGADA!

RESUMO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill], cultura anual amplamente produzida e consumida no mundo, é o principal produto do agronegócio brasileiro. Na safra 2019/2020, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu a posição de maior produtor mundial de soja. Apesar do feito, é importante que o melhoramento genético prossiga buscando por genótipos superiores. No desenvolvimento de novas cultivares de soja é fundamental a realização do pré-melhoramento através de estudos da diversidade genética. Estes estudos possibilitam o conhecimento da divergência genética entre possíveis genitores, para que se obtenha, por meio de cruzamentos futuros, ampla variabilidade nas gerações segregantes. Assim, este trabalho objetivou avaliar a diversidade genética entre 20 cultivares de soja por meio das distâncias genéticas estimadas a partir de 14 descritores morfológicos recomendados pela UPOV (International Union of New Varieties of Plants) e pelo SNPC (Serviço Nacional de Proteção de Cultivares), em diferentes aspectos e estádios da planta; e por meio de 39 marcadores RAPD e 40 microssatélites. Foram realizados três métodos de análise multivariada: análise de agrupamento de otimização de Tocher e o hierárquico (UPGMA) e, o gráfico (coordenadas principais). Além disso, foi realizada a análise de associação entre as matrizes de dissimilaridade dos dados morfológicos e moleculares (RAPD e SSR). As medidas de dissimilaridade apresentaram amplitude de 0,075 a 0,85, 0,041 a 0,217 e 0,16 a 0,63 para os descritores morfológicos, marcadores RAPD e marcadores microssatélites, respectivamente. As análises multivariadas formaram grupos distintos, mostrando que os descritores morfológicos, marcadores RAPD e marcadores microssatélites utilizados foram eficientes em distinguir as 20 cultivares de soja. As correlações entre as matrizes de dissimilaridade dos descritores morfológicos, marcadores RAPD e marcadores microssatélite foram 0,26371, 0,1192 e 0,18989, respectivamente, indicando que os descritores morfológicos, marcadores RAPD e microssatélites se complementam na distinção das 20 cultivares. Concluiu-se, portanto, que há variabilidade genética entre as 20 cultivares estudadas para os descritores morfológicos, marcadores RAPD e microssatélites utilizados. Além disso, fica claro que no estudo de diversidade genética, os marcadores moleculares podem ser usados como forma de complementação aos descritores morfológicos.

Palavras-chave: Soja. *Glycine max*. Descritores. Diversidade. RAPD. Microssatélites.

ABSTRACT

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill], an annual crop widely produced and consumed around the world, is the main product of the Brazilian agribusiness. In the 2019/2020 crop, Brazil overcome the USA and assumed the position of the world's largest soybean producer. Despite this achievement, it is important that genetic breeding programs continue to develop superior genotypes. In development of new soybean cultivars, the pre-breeding it is essential through studies of genetic diversity. These studies lead to the knowledge of the genetic divergence between possible parents, allowing to obtain wide variability in the segregating generations of future crosses. Therefore, this work aimed to estimate the genetic diversity among 20 soybean cultivars by means genetic distances estimated from 14 morphological descriptors recommended by the UPOV (International Union of New Varieties of Plants) and by the SNPC (Serviço Nacional de Proteção de Cultivares), in different aspects and stages of the plant; and through 39 RAPD markers and 40 microsatellites. Three methods of multivariate analysis were performed: Tocher's optimization and hierarchical (UPGMA) cluster analysis, and the graph (principal coordinates). Overmore, an analysis of the association between the dissimilarity matrices of the morphological and molecular data (RAPD and SSR) was executed. The measures of dissimilarity presented amplitude of 0.075 to 0.85, 0.041 to 0.217 and 0.16 to 0.63 for the morphological descriptors, RAPD markers and microsatellite markers, respectively. The multivariate analyses formed distinct groups, showing that the morphological descriptors, RAPD markers and microsatellite markers used were efficient in distinguishing the 20 soybean cultivars. The correlations between the dissimilarity matrices of the morphological descriptors, RAPD markers and microsatellite markers were low (0.26371, 0.1192 and 0.188989, respectively), indicating that the morphological descriptors, RAPD markers and microsatellites complement each other in distinguishing the 20 cultivars. Was concluded that have a genetic variability among the 20 cultivars studied for the morphological descriptors, RAPD markers and microsatellites used. In addition, it is clear that in the study of genetic diversity, molecular markers can be used as a way of complementing the morphological descriptors.

Keywords: Soybean. *Glycine max*. Descriptors. Diversity. RAPD. Microsatellites

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Aspectos gerais da soja	14
2.2 Aspectos morfológicos e agronômicos da soja.....	15
2.3 Melhoramento de soja no Brasil	19
2.4 Diversidade genética.....	21
2.5 Técnicas de análise da diversidade genética.....	23
2.5.1 Medidas de dissimilaridade e análises de agrupamento	23
2.5.2 Correlação entre matrizes de dissimilaridade	25
REFERÊNCIAS	26
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	32
ARTIGO – Diversidade genética entre cultivares de soja com base em marcadores morfológicos e moleculares.....	33
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1 Material genético	36
2.2 Descritores morfológicos.....	37
2.3 Extração de DNA e amplificação por PCR.....	37
2.4 Análise de dados	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5. CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS	50
ANEXOS	54

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma cultura anual produzida e consumida no mundo todo, tendo o Brasil como maior produtor mundial (CONAB, 2020). A produção de soja no Brasil apresenta constante crescimento principalmente em função do desenvolvimento de cultivares adaptadas às diferentes regiões produtoras, com alto rendimento e resistências às principais doenças e pragas (SEIXAS et al., 2020; BIZARI et al., 2017). A soja revela sua importância socioeconômica antes, durante e depois da sua produção, uma vez que suas múltiplas utilizações criam um complexo agroindustrial (CASTRO et al., 2015; VAL et al., 2014).

Novas cultivares são desenvolvidas anualmente por meio dos programas de melhoramento de soja, visando solucionar limitações reais ou potenciais relacionadas aos fatores bióticos e abióticos que podem causar prejuízos à produção. Além disso, novas cultivares devem apresentar alta produtividade, estabilidade de produção e ampla adaptabilidade às diferentes condições edafoclimáticas existentes na região em que é recomendada (CABRAL et al., 2020; COSTA et al., 2019; CERUTTI et al., 2020).

No melhoramento de soja utiliza-se basicamente estratégias que visam ampliar a variabilidade genética por meio das hibridações. Ao cruzar genótipos com alto grau de similaridade, obtém-se populações segregantes com pouca variabilidade, levando a um menor aproveitamento da variabilidade existente (FERREIRA JÚNIOR et al., 2015; NOGUEIRA, 2011). Assim, o estudo da diversidade genética é essencial em programas de melhoramento, uma vez que permite obter informações a respeito da divergência genética entre possíveis genitores, melhor direcionando cruzamento futuros.

A diversidade genética da soja pode ser avaliada por meio das distâncias genéticas estimadas a partir de marcadores morfológicos, que consistem em avaliações fenotípicas realizadas em diferentes aspectos da planta e em diferentes estádios de desenvolvimento; e também por meio de marcadores moleculares, como os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e microssatélites, os quais se mostram vantajosos na distinção de cultivares por serem independentes das condições ambientais e por permitirem identificar e caracterizar os genótipos acessando variações do DNA, não sendo necessário esperar que a planta chegue ao estágio final para ser avaliada (KACHARE et al., 2020; HAMID et al., 2017).

Em estudos da diversidade genética, sejam esses realizados por meio de marcadores morfológicos ou moleculares, o que se deseja é agrupar genótipos distintos, em que se deve encontrar homogeneidade dentro e heterogeneidade entre os grupos formados, tornando-se

possível a distinção de cultivares. Diante disto, no presente trabalho objetivou-se avaliar a diversidade genética entre cultivares de soja por meio das distâncias genéticas calculadas a partir de marcadores morfológicos e moleculares, gerando informações para serem utilizadas em futuros programas de melhoramento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill], cultura anual amplamente produzida e consumida no mundo, é o principal produto do agronegócio brasileiro (SEIXAS et al., 2020). Possui origem na China, cuja domesticação ocorreu por volta do século XI A.C (HYMOWITZ, 1970). No Brasil, a primeira referência de introdução da soja data de 1882 no Estado da Bahia, onde alguns genótipos foram introduzidos para os primeiros testes experimentais (ALMEIDA et al., 1999) e, devido às condições provenientes da latitude inferior à de sua origem, não se obteve sucesso. Os primeiros estudos, em São Paulo, foram relatados em 1892, no Instituto Agrônomo de Campinas. Foi no Rio Grande do Sul que o cultivo de soja apresentou evolução mais consistente, atingindo expressão econômica em meados de 1970 (BONATO & BONATO, 1987).

Com o passar dos anos a soja foi encontrando condições favoráveis para sua expansão no Brasil, tanto nos Estados tradicionalmente produtores (RS, SC, PR e SP) como em outros do Brasil Central (CAMARA, 2015). Alguns dos fatores que contribuíram para sua consolidação e desenvolvimento foram a rusticidade da cultura; a demanda do mercado externo; possibilidades de mecanização total; clima adequado; suporte tecnológico da pesquisa agrícola por meio do melhoramento genético; cultura sucessora do trigo, a qual possibilita o aproveitamento da mesma área, das máquinas e equipamentos, dos armazéns e da mão-de-obra; entre outros (BONATO & BONATO, 1987; PÍPOLO et al., 2015).

Na safra agrícola 2019/20 o Brasil alcançou a produção recorde de 124,8 milhões de toneladas, com um ganho de 4,3% em relação à safra 2018/2019, ultrapassando os Estados Unidos e assumindo a posição de maior produtor mundial de soja. Entre as safras 2000/01 e 2019/20 a produção brasileira de soja mais do que triplicou, correspondendo a 224,73% em evolução (CONAB, 2020). Dois elementos foram de fundamental importância para este crescimento, a saber: produtividade e área (SEIXAS et al., 2020). O Brasil dispõe de progresso em ambos, uma vez que possui área para expansão, assim como, programas de melhoramento genético que visam o desenvolvimento de cultivares com capacidade de adaptação às diferentes regiões produtoras do País, com alto rendimento e resistência às principais doenças e pragas (SEIXAS et al., 2020; BIZARI et al., 2017).

Na safra 2020 a área plantada da soja brasileira correspondeu a 37 milhões de hectares, o que representou um aumento de 3% em relação à safra anterior, fixada em 35,874 milhões de hectares (CONAB, 2020). Pode-se dizer que o cultivo da soja está presente em todas as regiões

do Brasil, com destaque para as regiões Sul e Centro-Oeste, onde se encontram os cinco maiores Estados produtores da cultura: Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Mato Grosso do Sul. Nota-se, também, avanço significativo de área e produção nas regiões Norte e Nordeste, devido ao crescimento desta cultura na Região do MATOPIBA (Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia) e no Pará (SEIXAS et al., 2020). A implantação da sojicultura em diferentes regiões do País tornou-se possível devido ao uso de cultivares adaptadas a regiões de baixa latitude, bem como à adoção de práticas de manejo adequadas para se obter alta produtividade (CAMARA, 2015).

Tamanha produção se justifica pelo fato de a cultura da soja apresentar inúmeras utilizações, uma vez que seus derivados oriundos do processamento industrial dos grãos estão inseridos em diversos setores das cadeias produtivas, como alimentação humana, nutrição animal, aplicações industriais, entre outras potencialidades (CAMARA, 2015; GESTEIRA, 2017). Entre elas, sua principal utilização se dá como matéria-prima para a indústria de esmagamento, que produz óleo e farelo (PÍPOLO et al., 2015). O óleo é destinado à produção de óleo de cozinha, margarinas, borrachas, cosméticos, fármacos, biodiesel, entre outros (CAMARA, 2015; SILVA, 2013). O óleo de soja tem sido a principal matéria-prima para a produção de biodiesel no Brasil (ANP, 2019). Após a extração do óleo, obtém-se o farelo, matéria-prima de alta qualidade para a fabricação de rações animais (SEIXAS et al., 2020).

Para o Brasil, o grão de soja é composto, em média, por 36,86% de proteína e 22,61% de óleo (LORINI, 2019). Os altos teores de proteína e óleo, juntamente com a alta produtividade e rusticidade, fazem da soja a cultura anual com maior produção de proteína no mundo, e ainda uma das fontes mais baratas de proteína (PÍPOLO et al., 2015; COSTA & SANTANA, 2013).

A relevância econômica da produção da soja não se limita apenas aos produtores, uma vez que suas múltiplas utilizações formam um complexo industrial, com potenciais fomentadores do desenvolvimento socioeconômico brasileiro antes, durante e depois da sua produção. A título de exemplo, tem-se o mercado de insumos e créditos, a assistência técnica, a indústria de processamento, os sistemas de transporte e comunicação e a armazenagem (COSTA et al., 2014; CASTRO et al., 2015; VALARINI, 2007).

2.2 Aspectos morfológicos e agronômicos da soja

Considerando que o entendimento da morfologia da planta é importante para a caracterização por meio de marcadores morfológicos, descreve-se a planta de soja cultivada a seguir.

A soja cultivada é uma cultura anual pertencente à família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Glycininae, gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* e forma cultivada *Glycine max* (L.) Merril. A planta de soja é herbácea com ciclo de vida (emergência à maturação) de 70 a 200 dias, a depender da cultivar, seja ela precoce ou tardia, das condições climáticas da região, da época de semeadura, da altitude, da latitude e da fertilidade do solo. Apresenta hábito de crescimento ereto a prostrado; altura da inserção do primeiro legume de 10 a 20 cm; hastes e legumes pubescentes na cor cinza ou marrom, com variação da intensidade de cor (SEDIYAMA et al., 2015).

O sistema radicular apresenta raízes principal e secundária, cujo desenvolvimento pode ser influenciado pela disposição das plantas e pelo nível de compactação do solo. Pequenos nódulos provenientes da interação simbiótica de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* podem ser encontrados, geralmente, na raiz principal. Estes nódulos transformam o nitrogênio do ar atmosférico em uma forma utilizável pela planta (PURCELL et al., 2014; SEDIYAMA et al., 2015).

As cultivares de soja podem ser classificadas quanto ao seu tipo de crescimento: determinado, semideterminado e indeterminado. Alguns atributos caracterizam o tipo determinado. Após o início do florescimento, cresce pouco e não ramifica; o florescimento em toda a extensão da planta ocorre praticamente ao mesmo tempo; os legumes e os grãos do topo e da base da planta se desenvolvem praticamente de forma simultânea; o tamanho das folhas do topo da planta são praticamente o mesmo das demais; e as plantas apresentam um longo racemo terminal no ápice do caule (NEUMAIER et al., 2000; FEHR & CAVINESS, 1977; SEIXAS et al., 2020).

Sobre o tipo indeterminado, a produção de nós no caule principal e o crescimento continuam após o início do florescimento, podendo dobrar a estatura da planta até a maturação; o florescimento ocorre de baixo para cima, portanto, pode-se ter ao mesmo tempo legumes bem desenvolvidas na base e flores no topo da planta; o desenvolvimento dos legumes e dos grãos ocorre de baixo para cima, assim, os legumes e grãos da metade inferior das plantas são mais adiantados que a metade superior; as plantas crescem e ramificam, mesmo durante florescimento, formação dos legumes e enchimento de grãos; as folhas dos topo são menores do que as folhas das demais partes da planta; e as plantas não apresentam racemo terminal no ápice do caule, mas sim pequenos racemos axilares. O tipo semideterminado apresenta atributos tanto do tipo determinado como do indeterminado (NEUMAIER et al., 2000; FEHR & CAVINESS, 1977; SEIXAS et al., 2020).

Uma planta de soja pode apresentar folhas cotiledonares, unifolioladas e trifolioladas no decorrer do seu desenvolvimento. As folhas cotiledonares surgem após a emergência da plântula. Duas folhas unifolioladas surgem exatamente no primeiro nó acima do nó cotiledonar, uma oposta a outra. Subsequentemente, desenvolvem-se as trifolioladas alternadamente (SEDIYAMA et al., 2015; PURCELL et al., 2014).

A soja é uma espécie autógama ($2n = 40$), cujas flores são completas e apresentam cleistogamia, isto é, a fecundação ocorre antes da abertura floral, favorecendo a autopolinização. As flores encontram-se nos racemos axilares ou terminais, variando de 2 a 35 por inflorescência e apresentam-se nas cores branca ou roxa (SEDIYAMA et al., 2015).

O fruto da soja é conhecido, comumente, como legume. O período de crescimento do legume varia de 20 a 25 dias, correspondendo com a fase em que as sementes atingem seu tamanho máximo. Cada legume pode conter de uma a cinco sementes, variando sob influência do ambiente e manejo adotado. As sementes de soja variam quanto à forma e a cor do tegumento e hilo (PURCELL, 2014; SEDIYAMA et al., 2015). Segundo Marcos Filho (1980), as sementes atingem máxima qualidade fisiológica no momento em que se tem a ausência de sementes verde-amareladas, com hilo homocromo, e de plantas com legumes verdes.

O ciclo da soja é dividido em estádios vegetativos (V) e estádios reprodutivos (R), como proposto por Fehr e Caviness (1977). Os estádios vegetativos descrevem e caracterizam o desenvolvimento vegetativo. A emergência é o primeiro deles (VE), caracterizando-se quando os cotilédones estão acima da superfície do solo, em ângulo maior ou igual a 90° em relação ao hipocótilo. O estágio seguinte é o VC, referente ao momento em que os cotilédones se encontram completamente abertos e expandidos, ou seja, quando as bordas das folhas unifolioladas não mais se tocam.

Os estádios seguintes são representados por sequência numérica de acordo com o desenvolvimento da folha imediatamente acima. Para a folha ser considerada completamente desenvolvida deve-se apresentar aberta, cujas bordas dos folíolos da folha do nó imediatamente acima não mais se tocam. Os estádios vegetativos numerados iniciam com V1, o qual apresenta folhas unifolioladas completamente desenvolvidas (opostas) no primeiro nó, ou seja, as bordas dos folíolos da primeira folha trifoliolada não mais se tocam. O estágio V2 refere-se quando se tem a primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida, isto é, quando as bordas dos folíolos da segunda folha trifoliolada não mais se tocam. Os seguintes estádios vegetativos são caracterizados de forma sucessiva (SEIXAS et al., 2020).

Os estádios reprodutivos são baseados no florescimento (R1 e R2), desenvolvimento de legumes (R3 e R4), desenvolvimento de grãos (R5 e R6) e maturação da planta (R7 e R8). O estágio R1 consiste no início do florescimento, quando se tem uma flor aberta em qualquer nó do caule. No estágio R2 tem-se o florescimento pleno, ou seja, tem-se uma flor aberta em um dos dois últimos nós do caule com folha completamente desenvolvida. Nas cultivares do tipo determinado de crescimento, os estádios R1 e R2 podem ocorrer simultaneamente. Nas cultivares classificadas como de crescimento indeterminado, existe um intervalo de aproximadamente 3 dias entre R1 e R2, devido à floração, que ocorre de baixo para cima (SEIXAS et al., 2020).

No estágio R3 tem-se o início da formação dos legumes, caracterizada pela presença de legume com 5 mm de comprimento em um dos quatro últimos nós do caule com folha completamente desenvolvida. Quando os legumes em um dos quatro últimos nós do caule com folha completamente desenvolvida atingem 2 cm tem-se o estágio R4, considerado o estágio com legumes completamente desenvolvidas. No estágio R5, inicia-se o enchimento dos grãos, fase na qual pode-se encontrar os grãos com 3 mm de comprimento em legumes em um dos quatro últimos nós do caule, com folha completamente desenvolvida (SEIXAS et al., 2020).

O estágio R6 apresenta grãos cheios e completos, com legume contendo grãos verdes preenchendo as cavidades do legume de um dos quatro últimos nós do caule, com folha completamente desenvolvida. Por fim, os dois últimos estádios referem-se à maturação da planta. Em R7 tem-se o início da maturação, quando um legume normal no caule apresenta coloração de maturidade. E no estágio R8, verifica-se a maturação plena, onde 95% dos legumes apresentam coloração de madura (SEIXAS et al., 2020).

A adaptação das diferentes cultivares à determinada região depende das exigências térmicas, fotoperiódicas e hídricas de cada uma (SEIXAS et al., 2020). As temperaturas do ar de 20 a 30 °C permitem o melhor crescimento e desenvolvimento da soja. Para que a germinação e emergência ocorram de forma rápida e uniforme, a temperatura ideal do solo no momento da semeadura é de 25 °C, podendo variar de 20 a 30 °C. O desenvolvimento vegetativo da soja é nulo ou pequeno quando a temperatura está abaixo de 10 °C, e quando expostas brevemente a temperaturas acima de 40 °C, há redução da taxa de crescimento e distúrbios, tanto na floração quanto no desenvolvimento de legumes e grãos (FARIAS et al., 2007; BOARD & KAHLON, 2011).

A floração da soja é induzida, de forma geral, por estímulos termo-fotoperiódicos. Temperaturas abaixo de 13 °C inibem ou tornam a indução do florescimento da soja mais tardio,

enquanto que altas temperaturas na fase de crescimento vegetativo normalmente causam florescimento precoce e diminuição da estatura da planta (FARIAS et al., 2007; SEIXAS et al., 2020).

A soja é uma planta de dias curtos, isto é, apresenta florescimento quando o tempo de exposição à luz, a cada dia, encontra-se abaixo do fotoperíodo crítico, específico de cada cultivar (PURCELL et al., 2014). Plantas de dias curtos, que recebem luz acima do fotoperíodo crítico permanecem no estágio vegetativo e, portanto, não florescem. Porém, quando submetidas a dias mais curtos, ou seja, recebendo luz abaixo do fotoperíodo crítico, apresentam período vegetativo reduzido, levando ao florescimento precoce e, conseqüentemente, a reduções na produtividade e no porte das plantas (ALMEIDA, 1999). Os estímulos fotoperiódicos variam de acordo com a latitude e a época do ano em que se realiza o plantio (SEIXAS et al., 2020). Quanto mais próximo da linha do equador, menor é a amplitude do fotoperíodo ao longo do ano, não havendo época do ano em que se tenha dias mais curtos, como é o caso das regiões do Brasil com menores latitudes (FARIAS et al., 2007). Por isto, recorre-se para a introdução de cultivares cujo período juvenil seja longo, proporcionando uma adaptabilidade mais ampla uma vez que torna-se possível sua utilização em faixas mais abrangentes de latitudes e de épocas de semeadura (FARIAS et al., 2007).

2.3 Melhoramento de soja no Brasil

Os programas de melhoramento de soja têm permitido o desenvolvimento de cultivares de soja adaptadas às diversas regiões produtoras do Brasil, um dos motivos pelos quais a cultura apresenta sucesso no agronegócio brasileiro (SEIXAS et al., 2020). Nestes programas busca-se solucionar limitações reais ou potenciais impostas pelos fatores bióticos e abióticos, os quais causam redução da produção. Os aumentos de produtividade e estabilidade de produção, sem a necessidade de um investimento adicional do produtor, tem se tornado possível devido ao desenvolvimento de novas cultivares. O uso de sementes de cultivares melhoradas deve oferecer alta produtividade, estabilidade de produção e ampla adaptabilidade às diferentes condições edafoclimáticas existentes na região em que é recomendada (ALMEIDA et al., 1999).

A pesquisa e o desenvolvimento de novas cultivares de soja ganhou maior estímulo com as garantias da Lei de Proteção de Cultivares (LPC), que regulamenta a produção, comércio e uso das sementes das cultivares registradas (PESKE, 2016; GESTEIRA, 2017). Segundo a Lei nº 9456/97, para uma cultivar ser passível de proteção ela deve apresentar distinguibilidade de outras cultivares, homogeneidade em plantio comercial em larga escala e estabilidade de suas

características distintivas em relação às gerações sucessivas. Tais requisitos podem ser comprovados por meio do Teste de Distinguibilidade, Homogeneidade e Estabilidade (DHE), realizado à campo, por meio da avaliação de características morfológicas, em diferentes estádios de desenvolvimento da planta (BRASIL, 2011).

No melhoramento da cultura da soja utiliza-se basicamente estratégias que visam ampliar a variabilidade genética por meio das hibridações, para então conduzir as populações segregantes por meio dos métodos tradicionais de melhoramento de autógamas e, posteriormente, selecionar e avaliar os genótipos com as características desejadas (ALMEIDA et al., 1999). Pode-se adotar também a exploração da variabilidade natural, por meio da introdução de germoplasma e seleção de linhas puras (FEHR, 1991; BORÉM, 2009).

Basicamente, uma boa cultivar apresenta características como alto rendimento, grande adaptação e resistência às principais doenças (EMBRAPA, 2008). Os primeiros programas de melhoramento de soja no Brasil se voltaram para a introdução do período juvenil longo, a fim de possibilitar o cultivo da soja em latitudes menores. Com este avanço, novas empresas de melhoramento surgiram com objetivos de se obter melhores rendimentos de grãos com enfoque na modificação de características como altura de plantas e ciclo das cultivares (SEDIYAMA et al., 2015). Com a necessidade de se obter estabilidade na produção, foram sendo consideradas nos programas de melhoramento características como resistência a pragas e doenças e tolerância aos fatores limitantes oriundos do solo e clima (ALMEIDA et al., 1999).

Uma vez que a soja é de dias curtos, sua sensibilidade ao fotoperíodo tornou-se uma restrição para uma adaptação mais ampla em latitudes mais baixas. A solução para este problema teve início em 1970, com a introdução do período juvenil longo, o qual torna as cultivares menos sensíveis ao fotoperíodo (ALMEIDA, 1999). Cultivares de soja com o período juvenil longo permanecem vegetativas por mais tempo do que as cultivares sensíveis ao fotoperíodo quando submetidas a dias curtos, e podem florescer mais cedo do que algumas cultivares convencionais sob dias mais longos (FARIAS et al., 2007). Assim, tem-se o desenvolvimento de cultivares adaptadas a diversas faixas latitudinais e épocas de semeadura (SEIXAS et al., 2020). Com isso, tornou-se possível o avanço da cultura do Sul ao Norte do Brasil.

A aplicação da biotecnologia no melhoramento de soja trouxe um facilitador no manejo de plantas daninhas e pragas nas lavouras por meio da soja transgênica (EMBRAPA, 2008). A primeira delas a ser comercializada, em 2005, foi a soja *Roundup Ready* (RR), que apresenta resistência ao herbicida glifosato (CAMARGOS, 2017). Devido ao sucesso da soja RR,

empresas de melhoramento investiram no desenvolvimento de novos transgênicos e lançaram, em 2013, a soja RR2 PRO, a qual confere resistência ao glifosato e a um complexo de lagartas. Com a simplificação do sistema de produção, a soja transgênica tem predominância superior a 95% nas áreas cultivadas (CONTINI et al., 2018).

O potencial produtivo e alta adaptabilidade das cultivares de soja são algumas das características prioritárias nos programas de melhoramento genético da cultura, pois, atrelado a tratos culturais e manejo adequados, consegue-se altos rendimentos (MAUAD et al., 2010). Outra característica importante considerada no melhoramento da soja é a precocidade, o que otimiza a segunda safra por meio da semeadura em um período com disponibilidade hídrica maior (RIBEIRO, 2018).

A escolha de genitores divergentes para realização das hibridações é fundamental para se obter gerações segregantes com ampla variabilidade genética em relação às características a serem selecionadas (ROSA, 2017). Assim, para que os programas de melhoramento sejam bem direcionados, é de fundamental importância o conhecimento da diversidade genética da soja para que a probabilidade de se obter um rearranjo de alelos com combinações favoráveis seja maior (BIZARI et al., 2014; NOGUEIRA, 2011).

2.4 Diversidade genética

As coleções de germoplasma de soja apresentam ampla variabilidade genética para caracteres fisiológicos, morfológicos e agrônômicos. Porém, no Brasil, no início dos programas de melhoramento, essa base genética era restrita, pois foram originárias de algumas poucas linhagens americanas (PRIOLLI, 2004; DONG, 2004). Isto ocorria pois nos cruzamentos dos programas de melhoramento de soja eram utilizados, normalmente, poucas cultivares e linhagens comerciais e, por apresentarem alto grau de similaridade, levava-se a uma diminuição de variabilidade (ALMEIDA et al., 1999). No entanto, com o surgimento da LPC houve um incentivo para o desenvolvimento de novas cultivares, levando programas de melhoramento a introduzirem genótipos de diferentes regiões do mundo, sendo possível encontrar, portanto, variabilidade genética em soja no Brasil (MACHADO et al., 2017; MARCONATO et al., 2016).

O melhoramento de plantas é um processo contínuo, portanto, o conhecimento da diversidade genética existente entre as cultivares de soja apresenta importância fundamental para um melhor direcionamento de cruzamentos futuros (BIZARI et al., 2014). Isto porque com a avaliação da diversidade é possível explorar a divergência genética entre cultivares. O uso de genitores divergentes resulta em uma maior variabilidade da população segregante, resultando

em uma maior probabilidade de rearranjar os alelos em novas combinações favoráveis (COX et al., 1985; NOGUEIRA, 2011).

O estudo da diversidade genética pode ser realizado por meio de avaliações fenotípicas, e também por marcadores moleculares e/ou bioquímicos (ROSA, 2017). A identificação de cultivares é feita por meio de descritores, que consistem em quaisquer características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas ou moleculares que sejam herdadas geneticamente (BRASIL, 1997). Descritores mínimos recomendados pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) são usados para caracterizar as cultivares passíveis de proteção, e consistem em características morfológicas avaliadas nas sementes, plântulas e planta adulta da espécie. Estes descritores morfológicos são passíveis de sofrerem efeitos do ambiente, tornando-os não estáveis, além de requererem tempo e espaço físico para as avaliações, já que há avaliações feitas na planta adulta (VIEIRA, 2000).

Devido a interferência que as condições ambientais podem causar sobre o fenótipo, os marcadores moleculares se tornaram uma ferramenta de fundamental importância no estudo da diversidade genética, pois permitiram identificar e caracterizar os genótipos acessando variações no DNA (RAMALHO et al., 2012). Dentre os marcadores moleculares utilizados para acessar a diversidade genética das espécies estão o RAPD, os microssatélites (SSR – *Simple Sequence Repeats*), entre tantos outros.

Os marcadores RAPD são utilizados no estudo da diversidade genética de inúmeras espécies, apresentam polimorfismo, são dominantes, de fácil execução, custo reduzido e de aplicação imediata a qualquer tipo de organismo (HAMID et al., 2017; KIM et al., 2021; KARIM et al., 2021). É uma técnica que apresenta limitações quanto a reprodutibilidade e por ser de caráter dominante. Mesmo diante de outras técnicas com menos limitações, os marcadores RAPD são utilizados principalmente por não precisarem de informações prévias sobre sequências de nucleotídeos do genoma da espécie (BINNECK et al., 2002), uma vez que utiliza-se de primers de sequência arbitrária, a qual deve conter um mínimo de 40% GC e atenda ao pré-requisito de não ser uma sequência palindrômica (GANIE et al., 2015). Além disso, existem formas de tornar esta técnica menos limitante quando a sua reprodutibilidade: otimização e estrito controle das condições de reação, como temperatura de anelamento e concentração de magnésio; qualidade da agarose; escolha de um protocolo de extração de DNA apropriado para remover quaisquer contaminantes; e, mais importante, considerar marcas com padrão mais confiáveis (bandas fortes) (GANIE et al., 2015; ARAUJO et al., 2003). Outra forma de torna-los mais confiáveis e reprodutíveis é por meio da conversão do marcador RAPD

em marcador SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), sequenciando o fragmento RAPD e construindo primers específicos para amplificação (FALEIRO, 2007).

Os marcadores microssatélites (SSR) são co-dominantes e consistem em repetições de sequências variando de dois a seis nucleotídeos, ocupando uma extensão de até 100 pares de bases (RAMALHO et al., 2012), as quais são flanqueadas por sequências únicas. Os primers produzidos são complementares às sequências únicas e apresentam extensão de 18 a 24 nucleotídeos, os quais, uma vez disponíveis para a espécie em estudo, são de fácil execução (HOFFMAN & BARROSO, 2006). Apresentam alto polimorfismo e boa distribuição no genoma, e, por isso, são utilizados em estudos para identificar divergência genética entre diferentes acessos de soja (ULLAH et al., 2021; KACHARE et al., 2020).

2.5 Técnicas de análise da diversidade genética

2.5.1 Medidas de dissimilaridade e análises de agrupamento

No estudo de diversidade genética, seja essa feita por características morfológicas ou moleculares, o que se deseja é agrupar genótipos em grupos distintos, obtendo-se homogeneidade dentro e heterogeneidade entre os grupos formados (CRUZ, 2008). Diferentes técnicas podem ser adotadas quando se deseja distinguir cultivares, por meio das análises multivariadas, mudando de acordo com o que se deseja obter e com a informação disponível (DINIZ FILHO, 2000). Para isto, é preciso obter a matriz de distância entre pares de indivíduos por meio da medida de distância (dissimilaridade) adequada para cada tipo de variável a ser analisada.

Ao trabalhar com descritores morfológicos em que se associa valores numéricos para as diferentes categorias, utiliza-se medidas de dissimilaridade obtidas de variáveis qualitativas multicategóricas, isto é, variáveis que não possuem valores quantitativos e que são definidas por várias categorias. Para este caso não se utiliza medidas de distância tradicionais, como a distância euclidiana, uma vez que não se pode afirmar que indivíduos com valores mais discrepantes sejam mais distantes fenotipicamente do que indivíduos com valores mais próximos (CRUZ et al., 2020). Assim, quando se tem variáveis multicategóricas em que cada acesso apresenta um único padrão fenotípico, o índice de dissimilaridade de coincidência simples pode ser usado:

$$d_{ii'} = \frac{D}{C + D}$$

D = discordância de categoria;

C = concordância de categoria.

Quando se trabalha com marcadores moleculares dominantes, como os RAPD, a informação alélica é codificada em um sistema binário, designando 1 para presença de banda e 0 para ausência. Para este tipo de informação, os coeficientes de similaridade e dissimilaridade mais utilizados são os de coincidência simples, de Jaccard e o de Nei e Li. O coeficiente de Jaccard é mais indicado por apresentar facilidade de interpretação, pois consiste em uma razão entre o número de coincidências e o número total de bandas e também por não considerar coincidências do tipo 0-0 (MEYER et al, 2004). Além disso, recomenda-se o uso do coeficiente de Jaccard para estudos da diversidade genética entre acessos conhecidos (CRUZ et al., 2020).

$$d_{ii'} = 1 - S_{ii'}$$

$$S_{ii'} = \frac{a}{a + b + c}$$

$S_{ii'}$ = coeficiente de Jaccard

a = valor que quantifica o número de coincidência do tipo 1 - 1 para cada par de cultivares;

b = valor de quantifica o número de discordância do tipo 1 - 0 para cada par de cultivares;

c = valor que quantifica o número de discordância do tipo 0 - 1 para cada par de cultivares.

Para marcadores moleculares codominantes, como os microssatélites, a codificação é feita por meio de códigos numéricos informando uma representação genotípica em função do número de alelos por cada loco. Ou seja, se um dado loco apresentar três alelos, tem-se possível as representações 11, 22 e 33 para as formas homozigotas e 12, 13 e 23 para as heterozigotas. Para este tipo de informação, a dissimilaridade pode ser estimada em função do número de alelos comuns por loco, por meio do complemento aritmético do índice de similaridade ponderado (CRUZ et al., 2020).

$$D = 1 - S_{ii'}$$

$$S_{ii'} = \frac{1}{2} \sum_{j=1}^L p_j c_j$$

$p_j = \frac{a_j}{A}$: peso associado ao loco j, determinado por:

a_j : número total de alelos do loco j

A: número total de alelos estudados

Sendo $\sum_{j=1}^L p_j = 1$

c_j : número de alelos comuns entre os pares de acessos i e i'.

Para se estudar a diversidade genética entre as cultivares, utiliza-se métodos de agrupamento, dentre os quais três se destacam: o método hierárquico da Ligação Média entre Grupos (UPGMA), que gera um dendrograma, o método de otimização (Tocher) e o método gráfico (coordenadas principais). O método gráfico consiste em realizar o agrupamento dos indivíduos com base nas dispersões, em relação a eixos cartesianos obtidos por coordenadas principais (CRUZ et al., 2020).

2.5.2 Correlação entre matrizes de dissimilaridade

A medida de associação entre diferentes matrizes de dissimilaridade pode ser obtida por meio do coeficiente de correlação de Pearson, devendo-se realizar um teste de significância, já que os valores de cada matriz não são independentes. Para isto, recomenda-se o uso do teste de significância de Mantel, o qual se baseia em um processo de aleatorização pelo qual várias estimativas de correlações são obtidas. Assim, a partir de uma das matrizes, realiza-se o embaralhamento por critério de permutação aleatória. As várias correlações são então ordenadas e testadas a 1% de probabilidade, após excluídos os valores extremos (CRUZ et al., 2020), ou seja, considerando 2000 permutações, para determinação do nível crítico a 1% de probabilidade, deverão ser excluídas as 20 estimativas de correlação dos extremos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. A.; KIIHL, R. A. S.; MIRANDA, M. A. C.; CAMPELO, G. J. A. Melhoramento de soja para regiões de baixas latitudes. In: QUEIROZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido / Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.
- ANP. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Publicações ANP. **Anuário Estatístico**, 2019. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em 10 de setembro de 2020.
- ARAÚJO, E. S.; SANTOS, A. M.; AREIAS, R. G. B. M.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Uso de RAPD para análise de diversidade genética em arroz. **Agronomia**, v. 37, n.1, p. 33-37, 2003.
- BINNECK, E.; NEDEL, J. L.; DELLAGOSTIN, O. A. Análise de RAPD na identificação de cultivares: uma metodologia útil?. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n.1, p. 183-196, 2002.
- BIZARI, E. H.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; VIANNA, V. F.; MEYER, A. S.; MAURO, A. O. Genetic diversity in early-maturing soybean genotypes based on biometric and molecular parameters. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 12, p. 259-265, 2014.
- BIZARI, E. H.; VAL, B. H. P.; PEREIRA, E. M.; DI MAURO, A. O.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H. Selection indices for agronomic traits in segregating populations of soybean. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 1, p. 110-117, 2017.
- BOARD, J. E.; KAHN, C. S. Soybean yield formation: what controls it and how it can be improved. In: EL-SHEMY, H. A. (Ed.). **Soybean physiology and biochemistry**. Rijeka: InTech Open Access Publisher, p. 1-36, 2011.
- BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. **A soja no Brasil: história e estatística**. (Documentos, 21). Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 61 p., 1987.
- BORÉM, A. (Ed.). **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 625 p., 2009.
- BRASIL. Decreto-lei 9.456 de 25 de abril de 1997. Lei de Proteção de Cultivares. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília-DF, 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. **Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 2009. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/protecao-de-cultivar/agricolas>>. Acesso em 5 de outubro de 2020.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de Cultivares no Brasil**. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2011.

- CABRAL, R. C.; MAEKAWA, S. C. E.; ZUFFO, A. M.; STEINER, F. Selection indices to identify drought-tolerant soybean cultivars. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. 1-25, 2020.
- CAMARA, G. M. S. **Introdução ao agronegócio soja**. São Paulo: USP/ESALQ – Departamento de Produção Vegetal, 2015.
- CAMARGOS, A. E. V. **Diversidade fenotípica e qualidade em sementes de cultivares de soja**. Dissertação (Mestrado em Agricultura) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2017.
- CASTRO, L. S.; MIRANDA, M. H.; LIMA, J. E. Indicadores sociais de desenvolvimento e a produção de soja: uma análise multivariada nos 150 maiores municípios produtores brasileiros. **Rev. Bras. de Gest. e Desenv. Regional**, v. 11, n. 1, p. 69-87, 2015.
- CERUTTI, P. H.; SANTOS, M.; MUNIZ, A. T.; RODRIGUES, A. R.; CARBONARI, L. T. S.; SCHWARZER, P. A. Desempenho de cultivares de soja em diferentes ambientes de cultivo. **Nativa**, v. 8, n. 3, p. 390-396, 2020.
- COELHO, A. S. G. **BOOD – Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridade genéticas através do procedimento de bootstrap, versão 3.0**. Goiânia-GO: Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Goiás, 2001.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília: CONAB, 2020.
- CONTINI, E.; GAZZONI, D.; ARAGÃO, A.; MOTA, M.; MARRA, R. **Complexo Soja – Caracterização e Desafios Tecnológicos – Parte 1**. Série Desafios do Agronegócio Brasileiro (NT1). Embrapa, 2018.
- COSTA, L. C.; TAVANTI, R. F. R.; TAVANTI, T. R.; PEREIRA, C. S. Desenvolvimento de cultivares de soja após inoculação de estirpes de *Bacillus subtilis*. **Nativa**, v. 7, n. 2, p. 126-132, 2019.
- COSTA, N. L.; SANTANA, A. C. Poder de mercado e desenvolvimento de novas cultivares de soja transgênicas e convencionais: análise da experiência brasileira. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 56, n. 1, p. 61-68, 2013.
- COSTA, N. L.; TEIXEIRA, O. A.; SANTANA, A. C. O desenvolvimento recente da cadeia produtiva da soja no Brasil: desafios e perspectivas da produção rural. **Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**, Goiânia/GO, 2014.
- COX, T. S.; KIANG, Y. T.; GORMAN, M. B.; RODGERS, D. M. Relationship between coefficient of parentage and genetic similarity indices in the soybean. **Crop Science**, v. 25, p. 529-532, 1985.

- CRUZ, C. D.; FERREIR, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Viçosa: UFV, 2020.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES: diversidade genética**. Viçosa: Editora UFV, 278 p., 2008.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES – versão Windows**. Viçosa-MG: UFV, 64 p., 2001.
- DINIZ FILHO, J. A. **Métodos filogenéticos comparativos**. Ribeirão Preto: Holos., 120 p., 2000.
- DONG, Y. S.; ZHAO, L. M.; LIU, B.; WANG, Z. W.; JIN, Z. Q.; SUN, H. The genetic diversity of cultivated soybean grown in China. **Theor. Appl. Genet.**, 2004.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de Produção de Soja – Região Central do Brasil**. (Sistemas de Produção, 12). Londrina, PR: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2008.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.
- FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da soja**. (Circular Técnica, 48). Londrina, PR: Embrapa Soja, 2007.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. (Special report, 80). Ames, Iowa: Iowa State University of Science and Technology, 11 p., 1977.
- FEHR, W. R. **Principles of cultivar development: Theory and Technique**. Ames, Iowa: Iowa State University, v. 1, 1991.
- FERREIRA JÚNIOR, J. A.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; ESPÍNOLA, S. M. C. G.; VIANNA, V. F.; DI MAURO, A. O. Diversidade genética em linhagens avançadas de soja oriundas de cruzamentos biparentais, quádruplos e óctuplos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 2, p. 339-351, 2015.
- GANIE, S. H.; UPADHYAY, P.; DAS, S.; SHARMA, M. P. Authentication of medicinal plants by DNA markers. **Plant Gene**, v. 4, p. 83-99, 2015.
- GESTEIRA, G. S. **Seleção de linhagens de soja precoce para produtividade e qualidade de grãos**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2017.
- HAMID, M. A. A.; MANDOUR, A. E.; ISMAIL, T. A. I.; AL-ZOHAIRY, A. M. Detection of genetic diversity in different soybean (*Glycine max* L.) cultivars using seed storage protein profiles and RAPD-PCR analysis. **Zagazig J. Agric. Res.**, v. 44, n.3, 2017.
- HOFFMANN, L. V.; BARROSO, P. A. V. **Marcadores moleculares como ferramentas para estudos de genética de plantas**. (Documentos, 147). Campina Grande – PB: Embrapa Algodão, 2006.

- HYMOWITZ, T. **On the domestication of the soybean**. *Econ. Bot.*, 24: 408-421, 1970.
- KACHARE, S.; TIWARI, S.; TRIPATHI, N.; THAKUR, V. V. Assessment of Genetic Diversity of Soybean (*Glycine max*) Genotypes Using Qualitative Traits and Microsatellite Markers. **Agric. Res.**, v. 9, n. 1, p. 23-34, 2020.
- KARIM, K.; MABROUKA, R.; SOUHAYLA, M.; FIRUZ, O.; MOHAMMED, E. Genetic diversity study on common Tunisia date palm (*Phoenix dactylifera* L.) pollinators revealed by morphological, physiological and molecular (RAPD) markers. **Journal of New Sciences, Agriculture and Biotechnology**, v. 81, n. 6, p. 4732-4744, 2021.
- KIM, H.; LEI, P.; WANG, A.; LIU, S.; ZHAO, Y.; HUANG, F.; YU, Z.; ZHU, G.; HE, Z.; TAN, D.; WANG, H.; MENG, F. Genetic diversity of castor bean (*Ricinus communis* L.) revealed by ISSR and RAPD markers. **Agronomy**, v. 11, 2021.
- KONAREV, V. G. Proteins in cultivar identification. In: International symposium ISTA, Leningrad, p. 9-14, 1988.
- LORINI, I. (Ed.). **Qualidade de sementes e grãos comerciais de soja no Brasil – safra 2017/2018**. (Documentos, 422). Londrina: Embrapa Soja, 2019.
- MACHADO, B. Q. V.; NOGUEIRA, A. P. O.; HAMAWAKI, O. T.; JORGE, G. L.; REZENDE, G. F.; GLASENAPP, J. S.; HAMAWAKI, R. L.; HAMAWAKI, C. D. L. Agronomic performance and genetic diversity among lines and soybean cultivars. **Biosci. J.**, v. 33, n. 6, p. 1419-1430, 2017.
- MARCONATO, M. B.; PEREIRA, E. M.; SILVA, F. M.; BIZARI, E. H.; PINHEIRO, J. B.; MAURO, A. O.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H. Genetic divergence in a soybean (*Glycine max*) diversity panel based on agro-morphological traits. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, 2016.
- MARCOS FILHO, J. **Maturidade fisiológica de sementes de soja**. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 15(4), p. 447-460, 1980.
- MAUAD, M.; SILVA, T. L. B.; ALMEIDA NETO, A. I.; ABREU, V. G. Influência da densidade de semeadura sobre características agronômicas na cultura da soja. **Revista Agrarian**, v. 3, n. 9, p. 175-181, 2010.
- MEYER, A. S.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA JÚNIOR, C. L. Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in maize (*Zea mays* L.). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 83-91, 2004.
- MONSANTO. **Intacta RR2 PRO**, 2020. Disponível em: <<http://www.intactarr2pro.com.br/intacta-rr2-pro>>. Acesso em 25 de setembro de 2020.
- NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A. L.; FARIAS, J. R. B. Estádios de desenvolvimento da cultura da soja. In: BONATO, E. R. (Ed.). **Estresses em soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, p. 19-44, 2000.

NOGUEIRA, A. P. O. **Correlações, análise de trilha e diversidade fenotípica e molecular em soja**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento), Viçosa – MG, 2011.

PESKE, S. T. O mercado de sementes no Brasil. **Seed News**, 2016. Disponível em: <<https://seednews.com.br/artigos/546-o-mercado-de-sementes-no-brasil-edicao-maio-2016>>. Acesso em 25 de setembro de 2020.

PÍPOLO, A. E.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; DEBIASI, H.; MANDARINO, J. M. G. **Teores de óleo e proteína em soja: fatores envolvidos e qualidade para a indústria**. (Circular Técnico, 86). Londrina, PR: Embrapa Soja, 2015.

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

PURCELL, L. C.; SALMERON, M.; ASHLOCK, L. **Arkansas soybean production handbook: soybean growth and development**. Manhattan: Arkansas State University, cap. 2, p. 1-8, 2014. Disponível em: <<https://www.uaex.edu/publications/pdf/mp197/chapter2.pdf>>. Acesso em 20 de setembro de 2020.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P.; SOUZA, E. A.; GONÇALVES, F. M. A.; SOUZA, J. C. **Genética na Agropecuária**. Lavras, MG: Editora UFLA, 2012.

RIBEIRO, F. O. **Seleção genotípica visando à precocidade em soja**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2018.

ROLHF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.11. New York, 470 p., 1992.

ROSA, D. P. **Diversidade fenotípica e molecular e relações entre caracteres de soja adaptada às regiões Sul, Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil**. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2017.

SAMMOUR, R. H. Using electrophoretic techniques in varietal identification, biosystematic analysis, phylogenetic relations and genetic resources management. **Journal os Islamic Academy of Sciences**, v. 4, n. 3, p. 221-226, 1991.

SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. **Soja: do plantio à colheita**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2015.

SEIXAS, C. D. S.; NEUMAIER, N.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; LEITE, R. M. V. B. C. (Ed.). **Tecnologias de produção da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 347 p., 2020.

SILVA, J. A. Avaliação do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel no Brasil – PNPB. **Revista de Política Agrícola**, n. 3, p. 18-31, 2013.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. (Ed.). **Isozymes in Plant Biology**. Springer, Dordrecht, 1989.

ULLAH, A.; AKRAM, Z.; MALIK, S. I.; KHAN, K. S. U. Assessment of phenotypic and molecular diversity in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] germplasm using morpho-biochemical attributes and SSR markers. **Genet. Resour. Crop Evol.**, 2021.

UPOV. INTERNATIONAL UNION FOR THE PROTECTION OF NEW VARIETIES OF PLANTS. **Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Geneva, 40 p., 1998.

VALARINI, J. P.; KUWAHARA, M. Y. O mercado da soja: evolução da commodity frente aos mercados internacional e doméstico. **Jovens Pesquisadores**, São Paulo, v. 4, p.10, 2007.

VIEIRA, E. S. N. **Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo carioca por meio de marcadores morfológicos e moleculares visando a certificação da pureza genética**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2000.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO – Diversidade genética entre cultivares de soja com base em marcadores morfológicos e moleculares

RESUMO

O Brasil apresenta-se como maior produtor mundial de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], cultura anual amplamente cultivada e consumida no mundo. Porém, mesmo que em posição de destaque de produção, o desenvolvimento de cultivares de soja é dinâmico em programas de melhoramento. O conhecimento da diversidade genética existente entre as cultivares de soja apresenta importância fundamental para o melhor direcionamento de cruzamentos futuros, uma vez que permite o conhecimento da divergência genética entre cultivares. Assim, este trabalho objetivou avaliar a diversidade genética entre 20 cultivares de soja por meio das distâncias genéticas estimadas a partir de 14 descritores morfológicos recomendados pela UPOV (International Union of New Varieties of Plants) e pelo SNPC (Serviço Nacional de Proteção de Cultivares), em diferentes aspectos e estádios da planta e, por meio de 39 marcadores RAPD e 40 microssatélites. Foram realizados três métodos de análise multivariada: análise de agrupamento de otimização de Tocher e o hierárquico (UPGMA) e, o gráfico (coordenadas principais). Além disso, foi realizada a análise de associação entre as matrizes de dissimilaridade. Foi possível avaliar a diversidade genética entre as 20 cultivares de soja por meio dos grupos formados a partir dos três métodos utilizados. As correlações entre as matrizes de dissimilaridade dos descritores morfológicos, marcadores RAPD e marcadores microssatélite foram 0,26371, 0,1192 e 0,18989, respectivamente, indicando que os descritores morfológicos, marcadores RAPD e microssatélites se complementam na distinção das 20 cultivares. Concluiu-se, portanto, que há variabilidade genética entre as 20 cultivares estudadas para os descritores morfológicos, marcadores RAPD e microssatélites utilizados, sendo as cultivares M 5705 IPRO, M 7739 IPRO e M 8210 IPRO as mais divergentes geneticamente em relação às demais. Além disso, fica claro que no estudo de diversidade genética, os marcadores moleculares podem ser usados como ferramenta para a complementação aos descritores morfológicos.

Palavras-chave: Soja. *Glycine max*. Descritores. Diversidade. RAPD. Microssatélites.

ABSTRACT

Brazil is the world's largest soybean producer [*Glycine max* (L.) Merrill], an annual crop widely cultivated and consumed around the world. However, even if in a prominent position of

production, the development of soybean cultivars is dynamic in breeding programs. The knowledge of the genetic diversity existing among soybean cultivars have fundamental importance for better targeting of future crosses, since it allows the knowledge of the genetic divergence between cultivars. Therefore, this work aimed to estimate the genetic diversity among 20 soybean cultivars by means genetic distances estimated from 14 morphological descriptors recommended by the UPOV (International Union of New Varieties of Plants) and by the SNPC (National Service for the Protection of Cultivars), in different aspects and stages of the plant, and through 39 RAPD markers and 40 microsatellites. Three methods of multivariate analysis were performed: Tocher's optimization and hierarchical (UPGMA) cluster analysis, and the graph (principal coordinates). Moreover, an analysis of the association between the dissimilarity matrices was performed. It was possible to estimate the genetic diversity among the 20 soybean cultivars by means the groups formed from the three methods used. The correlations between the dissimilarity matrices of the morphological descriptors, RAPD markers and microsatellite markers were low (0.26371, 0.1192 and 0.188989, respectively), indicating that the morphological descriptors, RAPD markers and microsatellites complement each other in distinguishing the 20 cultivars. It was concluded that there is genetic variability between the 20 cultivars studied for the morphological descriptors, RAPD markers and microsatellites used, with the cultivars M 5705 IPRO, M 7739 IPRO and M 8210 IPRO being the most genetically divergent from the others. Furthermore, it is clear that in the study of genetic diversity, molecular markers can be used as a tool to complement the morphological descriptors.

Keywords: Soybean. *Glycine max*. Descriptors. Diversity. RAPD. Microsatellites

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é amplamente cultivada no mundo, e o Brasil é o maior produtor mundial. O Brasil alcançou tal posição na safra agrícola 2019/20, quando alcançou a produção recorde de 124,845 milhões de toneladas, ultrapassando os Estados Unidos. Da safra 2000/01 para a safra 2019/20 a produção brasileira de soja mais do que triplicou, correspondendo a 224,73% de aumento (CONAB, 2020). Dois elementos são fundamentais para este crescimento: produtividade e área. O Brasil dispõe de progresso em ambos, uma vez que possui área para expansão, assim como, programas de melhoramento genético que visam o desenvolvimento de cultivares com capacidade de adaptação às diferentes

regiões produtoras do País, com alto rendimento e resistência às principais doenças e pragas (SEIXAS et al., 2020; BIZARI et al., 2017).

Tamanha importância se justifica pelo fato da cultura da soja apresentar inúmeras utilizações, uma vez que seus derivados oriundos do processamento industrial dos grãos estão inseridos em diversos setores das cadeias produtivas, como alimentação humana, nutrição animal, aplicações industriais e entre outras potencialidades (CAMARA, 2015; GESTEIRA, 2017). Além disso apresenta importância por ter um alto teor de proteína, cerca de 36,86% (LORINI, 2019), fazendo com que a soja seja a cultura anual com maior produção de proteína no mundo, e ainda uma das fontes mais baratas de proteína (PÍPOLO et al., 2015; COSTA & SANTANA, 2013).

Anualmente, novas cultivares são desenvolvidas em programas de melhoramento de soja e lançadas no mercado, visando solucionar limitações reais ou potenciais relacionadas aos fatores bióticos e abióticos que podem causar prejuízos à produção. Além disso, novas cultivares devem apresentar alta produtividade, estabilidade de produção e ampla adaptabilidade às diferentes condições edafoclimáticas existentes na região em que é recomendada (CABRAL et al., 2020; COSTA et al., 2019; CERUTTI et al., 2020).

No melhoramento de soja utiliza-se basicamente estratégias que visam ampliar a variabilidade genética por meio das hibridações, sendo essencial o cruzamento entre genótipos divergentes. Ao cruzar genótipos com alto grau de similaridade, obtém-se populações segregantes com pouca variabilidade, o que leva a um menor aproveitamento da variabilidade existente (FERREIRA JÚNIOR et al., 2015; NOGUEIRA, 2011). Assim, o estudo da diversidade genética é essencial para o melhoramento, uma vez que permite obter informações a respeito da divergência genética entre possíveis genitores e o melhor direcionamento de cruzamentos futuros.

A diversidade genética da soja pode ser avaliada por meio das distâncias genéticas estimadas por meio de descritores morfológicos, que consistem em avaliações fenotípicas realizadas em diferentes aspectos da planta e em diferentes estádios de desenvolvimento (MOURA et al., 2020); e também por meio de marcadores moleculares, como os marcadores RAPD e microssatélites, os quais se mostram vantajosos na distinção de cultivares por serem independentes das condições ambientais e por permitirem identificar e caracterizar os genótipos acessando variações do DNA, não sendo necessário esperar que a planta chegue ao estágio final para poder ser avaliada (KUMAWAT et al., 2015; HAMID et al., 2017). Estudos mostram que o acesso à diversidade genética da soja por meio da combinação de marcadores morfológicos e

moleculares é uma ferramenta eficiente para a seleção de genótipos superiores (SULISTYO et al., 2019; KACHARE et al., 2020; ULLAH et al., 2021).

No estudo da diversidade genética, seja ele realizado por meio de marcadores morfológicos ou moleculares, o que se deseja é agrupar genótipos distintos, em que se deve encontrar homogeneidade dentro e heterogeneidade entre os grupos formados, tornando-se possível a distinção de cultivares. Diante disto, no presente trabalho objetivou-se avaliar a diversidade genética entre cultivares de soja por meio de descritores morfológicos e marcadores moleculares, gerando informações para serem utilizadas em futuros programas de melhoramento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

Foram utilizados 20 cultivares de soja obtidas em diferentes programas de melhoramento soja (Tabela 1). O experimento foi conduzido no Laboratório de Genética Molecular e, em campo, no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Agropecuária da Universidade Federal de Lavras, situada em Lavras-MG, à latitude de 21°14' Sul, longitude 45°00' Oeste, altitude de 918 m, pluviosidade média anual de 1.530 mm e temperatura média de 19,3 °C. Em campo, foi utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados (DBC) com três repetições, sendo cada parcela formada por 4 linhas de 5 metros, utilizando a densidade de plantio de 13 sementes por metro linear.

Tabela 1. Cultivares de soja, seus obtentores e ano de lançamento.

Nº	Cultivar	Obtentor	Ano de lançamento
1	6160 RSF IPRO	GDM	2012
2	8473 RSF RR	GDM	2011
3	AS 3590 IPRO	D&PL	2016
4	AS 3680 IPRO	D&PL	2014
5	BMX Potência RR	GDM	2007
6	BRS 1003 IPRO	EMBRAPA	2014
7	BRS 1074 IPRO	EMBRAPA	2015
8	INT 7100 IPRO	CEI LTDA	2017
9	M 5705 IPRO	D&PL	2014
10	M 6210 IPRO	D&PL	2011
11	M 6410 IPRO	D&PL	2011
12	M 7739 IPRO	D&PL	2012
13	M 8210 IPRO	D&PL	2011
14	NS 7300 IPRO	SYNGENTA	2012

15	P95R51 RR	PIONEER	2011
16	P97R73 RR	PIONEER	2013
17	ST 721 IPRO	BASF S/A	2018
18	SYN 15640 IPRO	SYNGENTA	2015
19	TMG 7067 IPRO	TMG S/A	2016
20	TMG 7262 RR	TMG S/A	2011

Fonte: MAPA (2020).

2.2 Descritores morfológicos

Os descritores morfológicos utilizados foram os recomendados pela International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV, 1998) e pelo Serviço Nacional de Proteção de cultivares (SNPC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil. Ao nível de plântula (considerando o estágio VC), foram avaliadas presença de antocianina no hipocótilo e, se presente, intensidade da pigmentação de antocianina do hipocótilo. Ao nível de planta (avaliações correspondentes aos estádios R3 e R8), foram observados o tipo de crescimento, hábito de crescimento, cor da pubescência no terço médio da haste principal e intensidade da pubescência. As avaliações na folha foram realizadas no estágio R2 quanto a rugosidade, forma do folíolo lateral, tamanho do folíolo lateral e intensidade da cor verde. Para flor avaliou-se a cor. Para legume (considerando o estágio R8), avaliou-se cor do legume e intensidade da cor. Quanto à duração do ciclo vegetativo, avaliou-se o tempo de maturação.

2.3 Extração de DNA e amplificação por PCR

A extração do DNA de folhas jovens foi realizada por meio da adaptação do protocolo proposto por Dellaporta et al. (1983). Os materiais foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido, coletando-se cerca de 0,1 g do material macerado em microtubos de 1,5 ml. Logo após, foi adicionado 500 µl de tampão de extração (100 mM Tris pH=8,0; 50 mM NaCl; PVP 1,5%; 10 mM de β-mercaptoetanol) e 33 µl de SDS 20%, agitando-se e incubado-se os microtubos em banho maria a 65 °C por 10 minutos. Foi adicionado 160 µl de acetato de potássio 5M, e logo após os microtubos foram agitados, deixando-os no gelo por 30 minutos, agitado-os novamente e centrifugado-os a 14000 rpm por 10 minutos. 550 µl do sobrenadante foram transferidos para novo microtubo, o qual foi centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos. 500 µl do sobrenadante foram transferidos para novo microtubo, adicionando-se 500 µl de isopropanol, deixando-os no gelo por 20 minutos. Os microtubos foram agitados e centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado mantendo o *pellet* no microtubo. Adicionou-se 500 µl de etanol 70%, centrifugou-se a 14000 rpm por 10 minutos

e, logo após, removeu-se o sobrenadante. Deixou-se em temperatura ambiente para secar, e, por fim, foram ressuspensos em 58 µl de H₂O pura + 2 µl de RNase, deixando-se a temperatura ambiente por 20 minutos. As amostras de DNA extraídas foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoVue GE* e diluídas na concentração de 50 ng/µl de água bidestilada.

As reações de amplificação do DNA utilizando 39 RAPD (Anexo I) foram preparadas misturando-se os seguintes reagentes nas respectivas concentrações: 50 ng de DNA, à exceção do controle negativo da reação, onde se adicionou água, 3 µl de FIREPOL® Master Mix (12,5 mM MgCl₂) (Sinapse Biotecnologia LTDA), 1 µl de *primer* e 10 µl de água pura. O volume final de cada reação foi de 15 µl. Cada reação foi realizada em microtubos de 0,2 ml em termocicladores na seguinte programação: uma etapa de 3 minutos a 94 °C, para a desnaturação inicial do DNA, seguida de 40 ciclos, sendo cada um destes constituídos por 45 segundos à 94 °C para a desnaturação, 50 segundos à 35 °C para o anelamento do *primer*, e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C para o alongamento da cadeia de DNA. Após os 40 ciclos, mais dez minutos a 72 °C para a extensão final das cadeias, e manutenção a 4°C até a sua aplicação em gel de eletroforese. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese, em gel de agarose 1%.

As reações de amplificação do DNA utilizando 40 marcadores SSR (Anexo II) foram preparadas misturando-se os seguintes reagentes nas respectivas concentrações: 50 ng de DNA, à exceção do controle negativo da reação, onde se adicionou água, 3 µl de FIREPOL® Master Mix (12,5 mM MgCl₂) (Sinapse Biotecnologia LTDA), 1,5 µl de *primer (forward + reverse)* e 9,5 µl de água pura. O volume final de cada reação foi de 15 µl. Cada reação foi realizada em microtubos de 0,2 ml em termocicladores na seguinte programação: uma etapa de 3 minutos a 95 °C, para a desnaturação inicial do DNA, seguida de 35 ciclos, sendo cada um destes constituídos por 45 segundos à 94 °C para a desnaturação, 50 segundos para o anelamento do *primer*, cujas temperaturas variaram de acordo com o *primer* testado (53 ou 55 °C), e 1 minuto a 72 °C para o alongamento da cadeia de DNA. Após os 35 ciclos, mais dez minutos a 72 °C para a extensão final das cadeias, e manutenção a 4°C até a sua aplicação em gel de eletroforese. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese, em gel de agarose 2%.

2.4 Análise de dados

As diferentes categorias dos descritores morfológicos foram associadas a valores numéricos, e foi obtida a matriz de dissimilaridade utilizando o índice de dissimilaridade em função da concordância e discordância de categorias, de acordo com o estimador abaixo, o qual

expressa a porcentagem de coincidência de dissimilaridade considerando os vários descritores avaliados.

$$d_{ii'} = \frac{D}{C + D}$$

Em que:

D – discordância de categoria;

C – concordância de categoria.

As bandas RAPD foram codificadas em um sistema binário, utilizando 1 para presença e 0 para ausência, cujos dados foram submetidos a estimativa de dissimilaridade entre cada par de genótipos por meio do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard:

$$d_{ii'} = 1 - S_{ii'}$$

$$S_{ii'} = \frac{a}{a + b + c}$$

$S_{ii'}$ = coeficiente de Jaccard

As bandas dos microssatélites foram codificadas por meio de uma representação genotípica em função do número de alelos por cada loco, estimando-se a dissimilaridade em função do número de alelos comuns por loco, por meio do complemento aritmético do índice de similaridade ponderado:

$$D = 1 - S_{ii'}$$

$$S_{ii'} = \frac{1}{2} \sum_{j=1}^L p_j c_j$$

$p_j = \frac{a_j}{A}$: peso associado ao loco j, determinado por:

a_j : número total de alelos do loco j

A: número total de alelos estudados

$$\text{Sendo } \sum_{j=1}^L p_j = 1$$

c_j : número de alelos comuns entre os pares de acessos i e i'.

As matrizes de distância foram utilizadas para realizar as análises multivariadas por meio dos métodos de agrupamento de otimização (Tocher) e hierárquico (UPGMA), e o gráfico (coordenadas principais). Além disso, realizou-se a associação entre as matrizes de dissimilaridade dos dados morfológicos e moleculares por meio do teste de Mantel (1967), com

base em 1000 permutações. Todas as análises foram realizadas através do software estatístico GENES (CRUZ, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os descritores morfológicos a dissimilaridade entre os pares de cultivares foi dada pelo índice de dissimilaridade de coincidência simples, em que os valores mais próximo de zero indicam maior similaridade e os valores mais próximos de 1 indicam maior dissimilaridade. Nas medidas de dissimilaridade obtidas para os 14 descritores morfológicos foi observada amplitude de 0,075 a 0,85, demonstrando que há variabilidade genética entre as 20 cultivares de soja estudadas. Vieira et al. (2009) obteve amplitude de 0,30 a 0,73 nas medidas de dissimilaridade de 10 cultivares de soja por meio de descritores morfológicos.

Os menores valores de dissimilaridade foram entre as cultivares AS 3590 IPRO e BMX Potência RR, ST 721 IPRO e BMX Potência RR e BRS 1003 IPRO e INT 7100 IPRO. Portanto, são as cultivares menos dissimilares quanto aos descritores morfológicos. Dois genitores que apresentam pequenas distâncias genéticas entre si tendem a compartilhar muitos genes ou alelos em comum, assim, quando cruzados, proporcionam pouca complementariedade, resultando em uma maior probabilidade de se obter uma população segregante com baixa variabilidade (CRUZ et al., 2020). Por outro lado, foram obtidas maiores distâncias genéticas entre os seguintes pares de cultivares: AS 3680 IPRO e BRS 1074 IPRO, BRS 1003 IPRO e M 8210 IPRO e INT 7100 IPRO e M 8210 IPRO. Maiores valores indicam divergência genética e presença de variabilidade genética entre cultivares (RIGON et al., 2012). Ao cruzar genitores divergentes, espera-se que a população segregante apresente uma maior variabilidade, uma vez que há maior probabilidade de apresentarem diferença em grande número de locos, e assim, tornar possível o rearranjo dos alelos em novas combinações favoráveis (COX et al., 1985; KACHARE et al., 2020).

A matriz de dissimilaridade dos descritores morfológicos foi utilizada para realizar a análise de agrupamento pelo método de otimização de Tocher, que resultou na formação de 7 grupos, assim distribuídos: 12 cultivares (60%) no grupo 1; 2 cultivares (10%) no grupo 2; 2 cultivares (10%) no grupo 3; e 1 cultivar (5%) nos grupos 4, 5, 6 e 7 (Tabela 2). Estes resultados mostram que as distâncias genéticas estimadas a partir dos descritores morfológicos foram capazes de distinguir as 20 cultivares, uma vez que houve formação de grupos. Villela (2013) obteve a formação de 7 grupos para as 74 cultivares de soja RR estudados pelo método de Tocher ao estudar a diversidade por meio de caracteres agronômicos.

Tabela 2. Agrupamento de 20 cultivares de soja pelo método de otimização de Tocher com base em 14 descritores morfológicos.

Grupo	Cultivares
1	3, 5, 17, 14, 19, 18, 2, 11, 8, 10, 6 e 7
2	1 e 4
3	12 e 13
4	16
5	20
6	15
7	9

O dendrograma obtido por meio da análise de agrupamento hierárquico (UPGMA), cujo corte significativo foi realizado em 55,85% de dissimilaridade, formou quatro grupos (Figura 1). O grupo 1 foi formado por 2 cultivares, o grupo 2 por 1 cultivar, o grupo 3 por 13 cultivares e o grupo 4 por 4 cultivares. Machado et al. (2017), avaliaram 24 genótipos de soja para características agronômicas e obtiveram quatro grupos adotando-se ponto de corte de 40% de dissimilaridade. A correlação cofenética foi de 0,77, significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Mantel, enquanto o grau de distorção foi de 4,51%. A correlação cofenética consiste na correlação da matriz de distâncias originais com a matriz de distâncias do dendrograma e, segundo Cruz et al. (2012), coeficientes de correlação cofenético de 0,70 são considerados suficientes indicadores de bom ajuste entre a representação gráfica e sua matriz original. O coeficiente de correlação cofenética consiste em uma correlação linear de Pearson entre os elementos da matriz de dissimilaridade e os elementos da matriz cofenética (matriz de distâncias entre as cultivares obtida a partir do dendrograma), e fornece informação a respeito da consistência do agrupamento (CARGNELUTTI FILHO et al., 2010). Quanto maior o valor da correlação, menor será a distorção provocada pelo agrupamento. De acordo com Cruz et al. (2020), valores de distorção inferiores a 20% são satisfatórios para a representação gráfica do dendrograma. Portanto, o agrupamento das 20 cultivares avaliadas pelos 14 descritores morfológicos apresentou consistência.

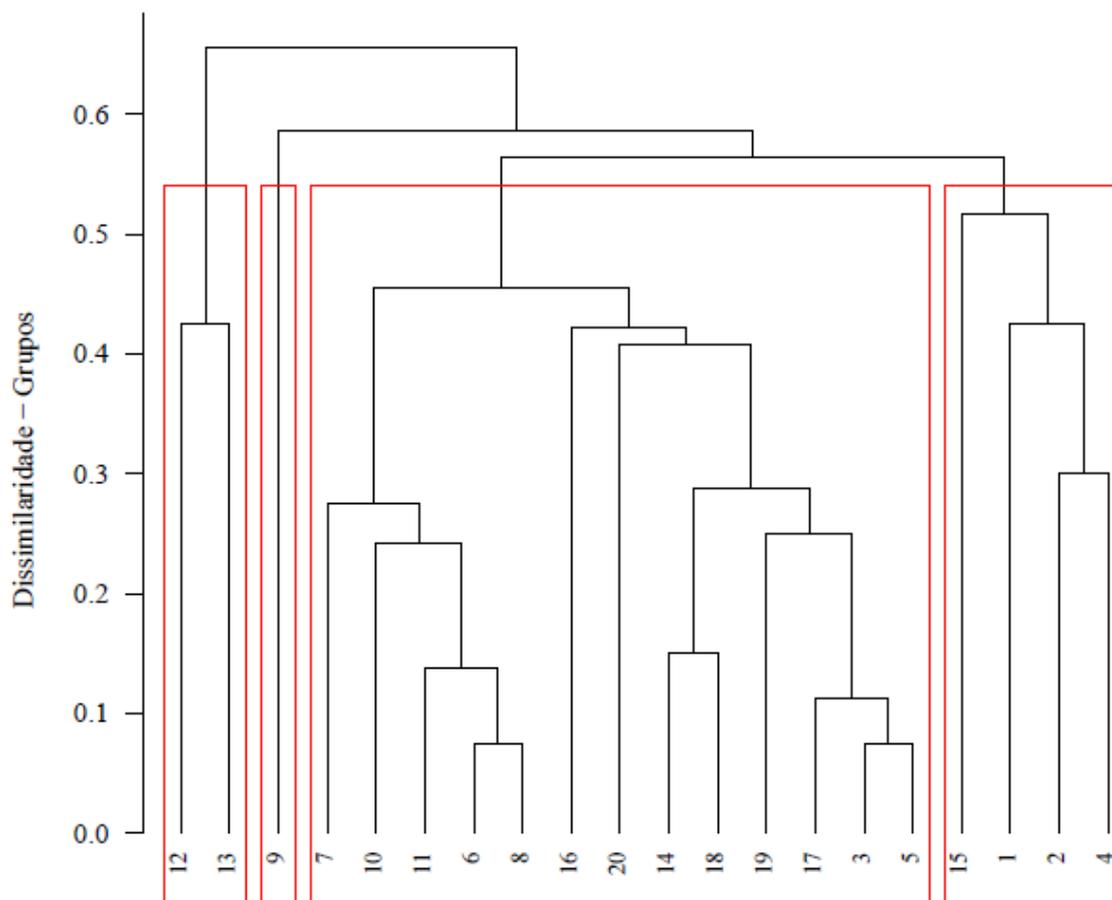


Figura 1. Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando 20 cultivares e 14 descritores morfológicos.

Com base nos agrupamentos Tocher e UPGMA,

Pode-se observar que as cultivares 12 e 13 poderiam ser cruzadas com as cultivares 2 e 4, por exemplo, uma vez que pertencem a grupos distintos. Isso evidencia que são cultivares dissimilares e, por isso, podem ser promissoras em cruzamento futuros com o objetivo de se obter uma população segregante com ampla variabilidade. Em ambos os métodos de análise de agrupamento as cultivares 1, 4 e 15 permaneceram em grupos diferentes do grupos com maior número de cultivares similares, mostrando serem cultivares dissimilares da maioria das cultivares que formaram grupos maiores.

O gráfico da análise das coordenadas principais com a distribuição gráfica dos 20 genótipos para os descritores morfológicos utilizados está apresentado na Figura 2, de forma que se tenha melhor resolução dos agrupamentos das cultivares. Foi apresentada uma porcentagem da variabilidade acumulada nos primeiros três primeiros eixos gerados de 69,66%, sendo possível separar as cultivares em 7 grupos e indicando a variabilidade genética existente entre as 20 cultivares. A projeção das coordenadas principais reforça o posicionamento das cultivares mais distintas (9, 12 e 13).

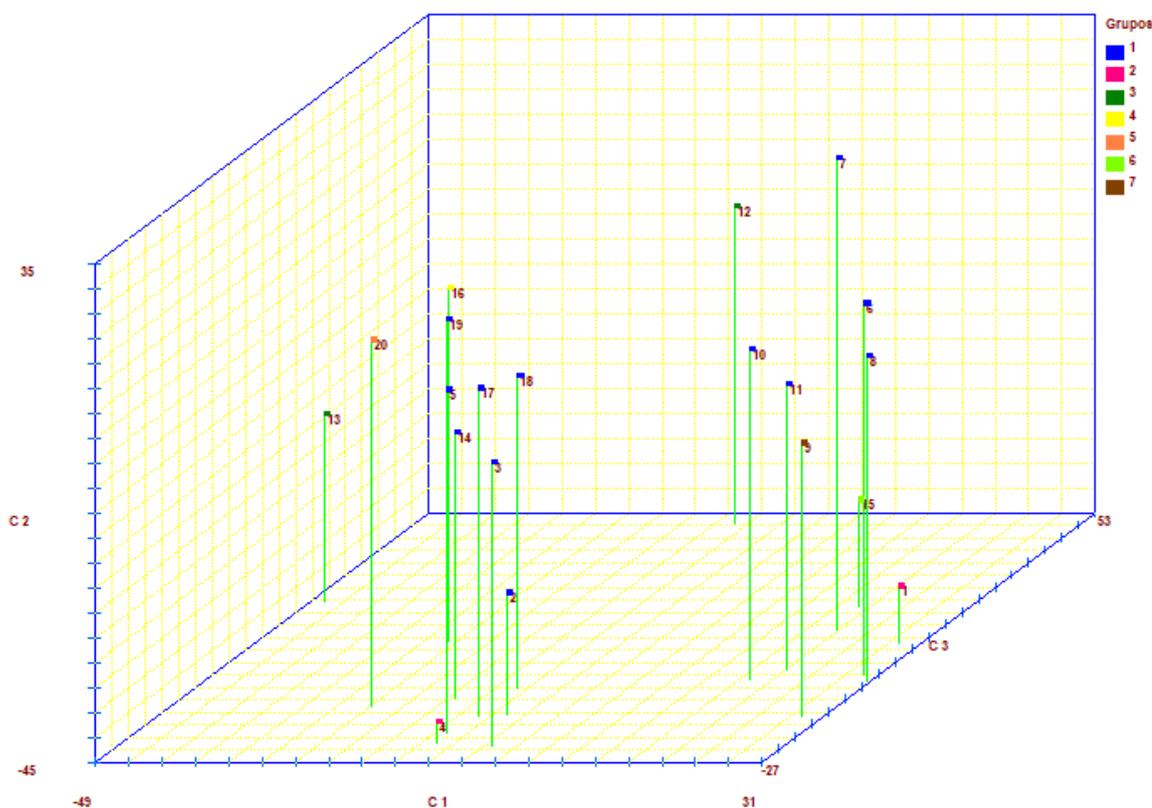


Figura 2. Análise das coordenadas principais da dissimilaridade genética entre 20 cultivares para os 14 descritores morfológicos avaliados.

Dos 39 marcadores RAPD utilizados, todos amplificaram e 22 (56,41%) mostraram-se polimórficos, utilizando-se para análise apenas bandas de melhor qualidade e visualização dos produtos de amplificação. A dissimilaridade entre as cultivares ao utilizar dados dos marcadores RAPD polimórficos foi estimada por meio do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard. As medidas de dissimilaridade para os marcadores RAPD se apresentaram no intervalo de 0,041 a 0,217 que, apesar de estreito, permitiu a formação de grupos nos três métodos de agrupamento utilizados.

Seis grupos foram formados pelo método de otimização de Tocher para as 20 cultivares de acordo com os marcadores RAPD utilizados. O primeiro formado por 9 das cultivares (45%), o grupo 2 formado por 7 cultivares (35%) e os grupos 3, 4, 5 e 6 formados por uma cultivar (5%) (Tabela 3).

Tabela 3. Agrupamento de 20 cultivares de soja pelo método de otimização de Tocher com base em 22 marcadores RAPD.

Grupos	Cultivares
1	9, 10, 16, 6, 7, 8, 5, 18 e 17
2	13, 14, 4, 2, 1, 11 e 3
3	12
4	15
5	19
6	20

A análise de agrupamento realizada pelo método UPGMA formou três grupos, realizando corte significativo em 14,42% de dissimilaridade (Figura 3). O primeiro grupo constituiu-se de 13 cultivares, o segundo grupo de 1 cultivar e o terceiro grupo de 6 cultivares. O coeficiente de correlação cofenético, significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Mantel, foi de média magnitude (65,43%) e o grau de distorção foi de 2,94%. Mesmo com a formação de grupos incluindo diferentes cultivares, pode-se observar que a cultivar 12 apresentou-se isolado dos demais cultivares tanto no método de Tocher como no UPGMA.

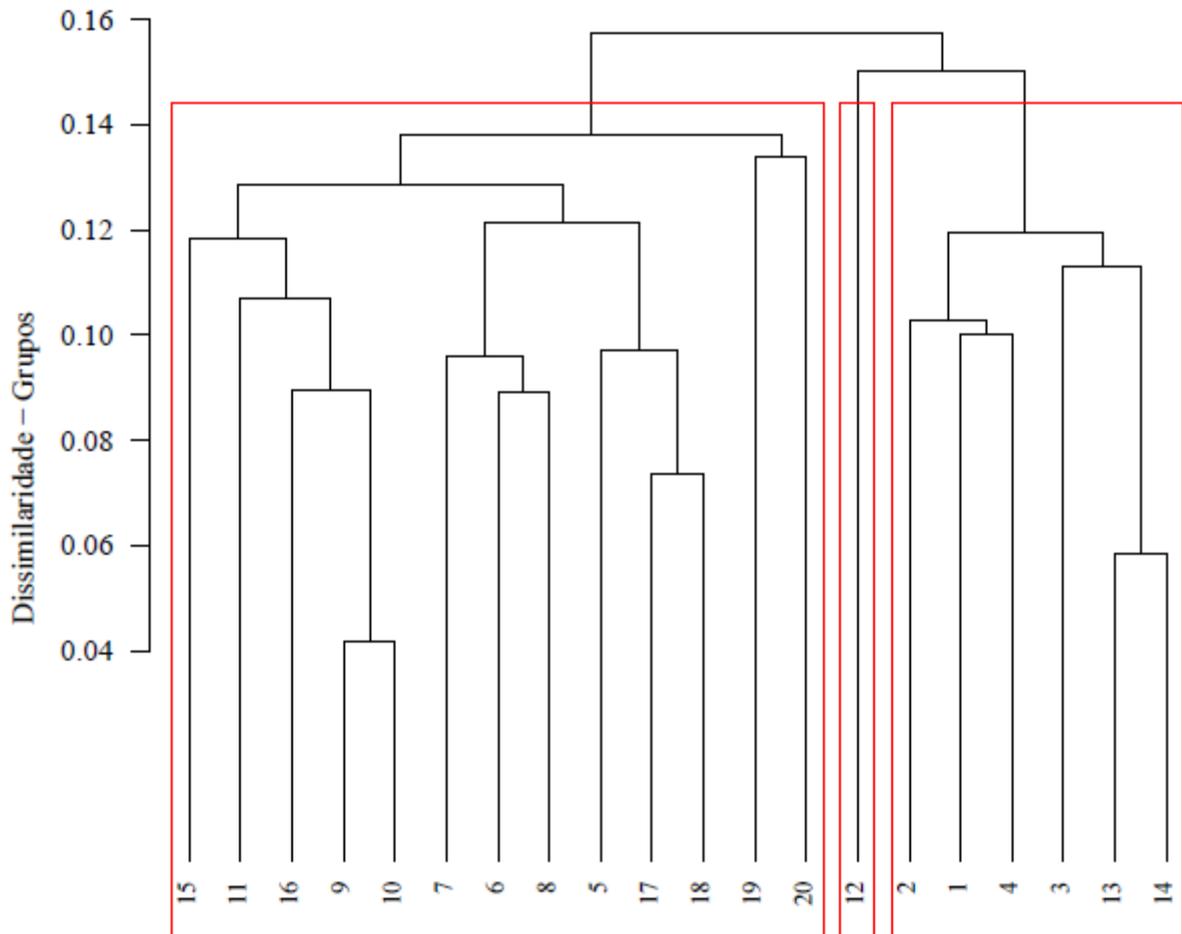


Figura 3. Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando 20 cultivares e 22 marcadores RAPD.

Na Figura 4 tem-se o gráfico da análise das coordenadas principais com a distribuição gráfica dos 20 genótipos para os marcadores RAPD utilizados. Foi apresentada uma porcentagem da variabilidade acumulada nos primeiros três primeiros eixos gerados de 56,57%, sendo possível separar as cultivares em 6 grupos e indicando a variabilidade genética existente entre as 20 cultivares. A projeção das coordenadas principais reforça o posicionamento da cultivar 12 como mais distinta.

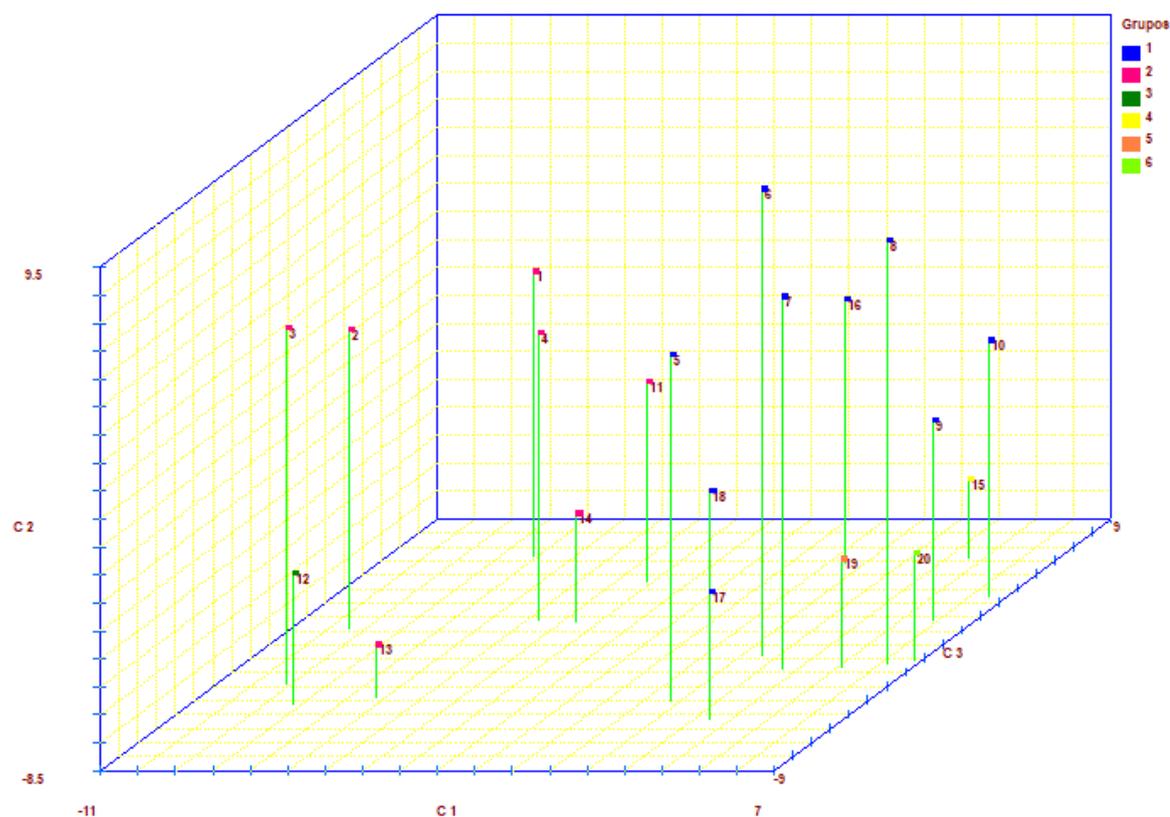


Figura 4. Análise das coordenadas principais da dissimilaridade genética entre 20 cultivares para os 22 marcadores RAPD avaliados.

Dos 40 marcadores microssatélites utilizados, 39 amplificaram e 24 (61,54%) foram polimórficos. Para os marcadores microssatélites a dissimilaridade ente os pares de cultivares foi estimada pelo complemento aritmético do índice de similaridade ponderado. As medidas de dissimilaridade variante de 0,16 a 0,63, demonstrando que há variabilidade genética entre as cultivares de soja para os marcadores microssatélites avaliados. As menores medidas de dissimilaridade foram entre as cultivares BRS 1074 IPRO e TMG 7067 IPRO e INT 7100 IPRO e M 6410 IPRO. A maior medida de dissimilaridade foi entre as cultivares M 5705 IPRO e M 8210 IPRO.

A análise de agrupamento pelo método de otimização de Tocher formou 9 grupos, distribuídos em: 4 cultivares (20%) no grupo 1, 5 cultivares (25%) no grupo 2, 2 cultivares (10%) nos grupos 3, 4, 5 e 6 e 1 cultivar (5%) nos grupos 7, 8 e 9 (Tabela 4).

Tabela 4. Agrupamento de 20 cultivares de soja pelo método de otimização de Tocher com base em 24 marcadores microssatélites.

Grupos	Cultivares
1	7, 19, 15 e 17
2	8, 11, 6, 16 e 10
3	3 e 14
4	1 e 4
5	5 e 18
6	12 e 13
7	2
8	20
9	9

O método de agrupamento UPGMA gerou um dendrograma com um corte significativo em 37,78% de dissimilaridade (Figura 5), formando três grupos. O grupo 1 é formado por 7 cultivares, o grupo 2 por 9 cultivares e o grupo 4 por 4 cultivares. O coeficiente de correlação cofenético foi de 63,38%, significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Mantel, e o grau de distorção foi de 3,13%. Pode-se realizar o cruzamento, portanto, das cultivares do grupo 1 com as cultivares do grupo 3, uma vez que compõem grupos distintos.

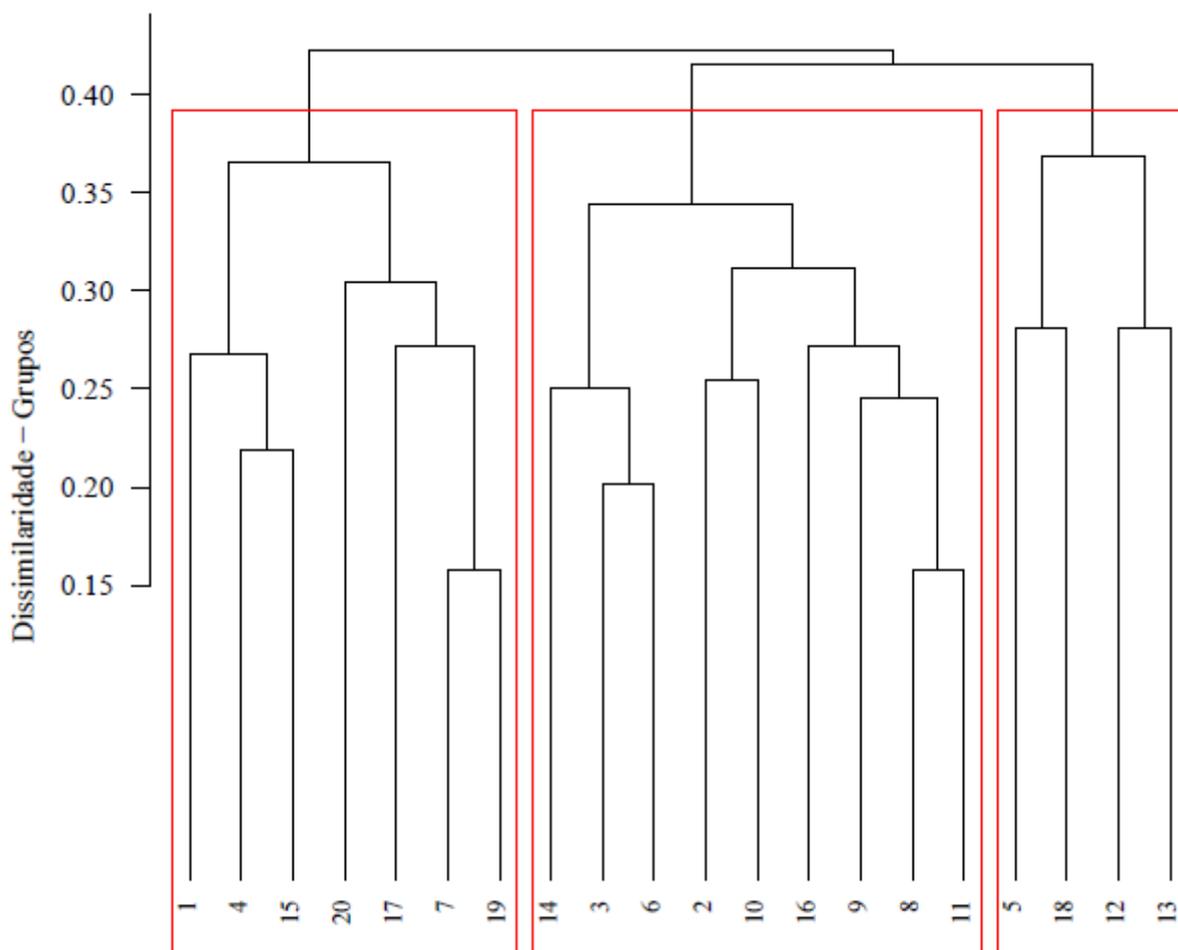


Figura 5. Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando 20 cultivares e 24 marcadores microssatélites.

O gráfico da análise das coordenadas principais com a distribuição gráfica dos 20 genótipos para os marcadores microssatélites utilizados está apresentado na Figura 6, em que se obteve 9 grupos e foi apresentada uma porcentagem da variabilidade acumulada nos primeiros três primeiros eixos gerados de 57,40%, indicando que há variabilidade genética existente entre as 20 cultivares para os marcadores microssatélites utilizados. A projeção das coordenadas principais reforça o posicionamento das cultivares 12 e 13 como as mais distintas.

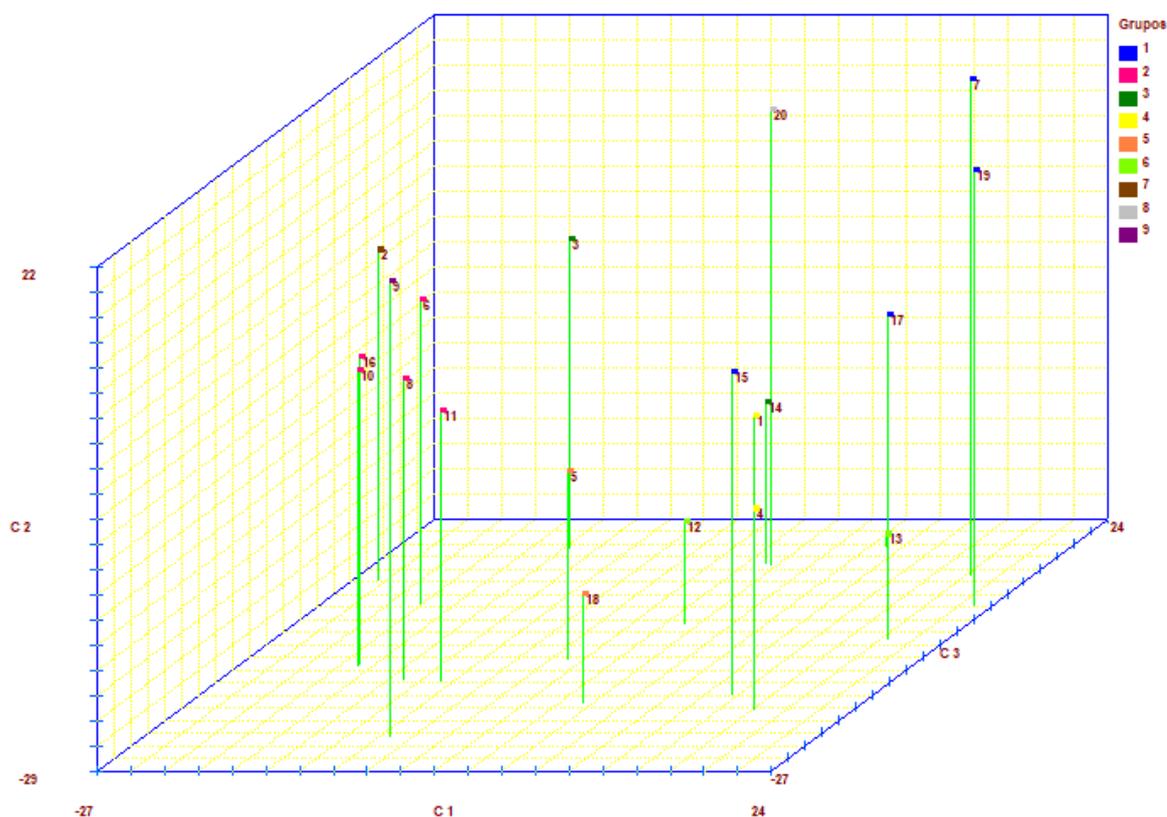


Figura 6. Análise das coordenadas principais da dissimilaridade genética entre 20 cultivares para os 24 marcadores microssatélites avaliados.

As correlações entre as matrizes de dissimilaridade dos descritores morfológicos, marcadores RAPD e marcadores microssatélites são apresentadas na Tabela 5. Embora as correlações tenham sido significativas ($p < 0,01$) pelo teste de Mantel, desconsidera-se a existência de correlação entre as matrizes de dissimilaridade, uma vez que a possibilidade de um, por exemplo, um fenótipo ser correlacionado com um marcador aleatório é quase nulo. Estes resultados confirmam que os descritores morfológicos, marcadores RAPD e microssatélites se complementam, uma vez que apresentam estimadores diferentes.

Tabela 5. Coeficientes de correlação entre as matrizes de dissimilaridade de distâncias genéticas calculadas a partir de marcadores morfológicos (D1), marcadores RAPD (D2) e marcadores microssatélites (D3), obtidas pela avaliação de 20 cultivares de soja.

Matrizes	Coefficiente de correlação (r)
D1 x D2	0.26371**
D1 x D3	0.1192**
D2 x D3	0.18989**

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

Os descritores morfológicos foram capazes de distinguir as cultivares de soja, porém, como forma de complementação às informações obtidas, os marcadores moleculares entram

com fundamental papel, uma vez que as avaliações realizadas com marcadores moleculares (RAPD e microssatélite) fornecem informações adicionais de dissimilaridade entre as cultivares por meio da formação de grupos distintos. Além disso, os marcadores moleculares são independentes das condições ambientais e permitem identificar e caracterizar os genótipos acessando variações do DNA.

A identificação e seleção de genótipos contrastantes para uma dada característica não implica em uma população segregante com ampla variabilidade (SANTOS et al., 2012). Isto porquê pode ocorrer de dois genótipos contrastantes para uma dada característica, um melhor e um pior, serem estritamente relacionados pelo fato de serem indivíduos de uma mesma população. Por isso, é indicado selecionar genitores que apresentem bom desempenho per se para as características de interesse, e que sejam geneticamente distantes entre si, levando então a uma maior contribuição com um arranjo genético distinto e eficaz (CRUZ et al., 2020). Além da importância no melhoramento genético das culturas, o estudo da diversidade genética é importante para o gerenciamento e proteção eficientes da variabilidade genética disponível (BISEN et al., 2015).

5. CONCLUSÃO

Foi possível avaliar a diversidade genética entre as 20 cultivares de soja por meio dos agrupamentos formados a partir dos três métodos de análise utilizados. As cultivares M 5705 IPRO, M 7739 IPRO e M 8210 IPRO podem ser utilizadas em cruzamentos com as demais, uma vez que se apresentaram, de forma recorrente, em grupos distintos das demais para os diferentes marcadores e diferentes métodos de análise utilizados. Assim, os descritores morfológicos e os marcadores RAPD e microssatélite foram eficientes em diferenciar as cultivares de soja.

REFERÊNCIAS

- BISEN, A.; KHARE, D.; NAIR, P.; TRIPATHI, N. SSR analysis of 38 genotypes of soybean [*Glycine max* (L) Merr.] genetic diversity in India. **Physiol Mol Biol Plants**, v. 21, n. 1, p. 109-115, 2015.
- BIZARI, E. H.; VAL, B. H. P.; PEREIRA, E. M.; DI MAURO, A. O.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H. Selection indices for agronomic traits in segregating populations of soybean. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 1, p. 110-117, 2017.
- CABRAL, R. C.; MAEKAWA, S. C. E.; ZUFFO, A. M.; STEINER, F. Selection indices to identify drought-tolerant soybean cultivars. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. 1-25, 2020.

- CAMARA, G. M. S. **Introdução ao agronegócio soja**. São Paulo: USP/ESALQ – Departamento de Produção Vegetal, 2015.
- CARGNELUTTI FILHO, A.; RIBEIRO, N. D.; BURIN, C. Consistência do padrão de agrupamento de cultivares de feijão conforme medidas de dissimilaridade e métodos de agrupamento. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 45, n. 3, p. 236-243, 2010.
- CERUTTI, P. H.; SANTOS, M.; MUNIZ, A. T.; RODRIGUES, A. R.; CARBONARI, L. T. S.; SCHWARZER, P. A. Desempenho de cultivares de soja em diferentes ambientes de cultivo. **Nativa**, v. 8, n. 3, p. 390-396, 2020.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília: CONAB, 2020.
- COSTA, L. C.; TAVANTI, R. F. R.; TAVANTI, T. R.; PEREIRA, C. S. Desenvolvimento de cultivares de soja após inoculação de estirpes de *Bacillus subtilis*. **Nativa**, v. 7, n. 2, p. 126-132, 2019.
- COSTA, N. L.; SANTANA, A. C. Poder de mercado e desenvolvimento de novas cultivares de soja transgênicas e convencionais: análise da experiência brasileira. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 56, n. 1, p. 61-68, 2013.
- COX, T. S.; KIANG, Y. T.; GORMAN, M. B.; RODGERS, D. M. Relationship between coefficient of parentage and genetic similarity indices in the soybean. **Crop Science**, v. 25, p. 529-532, 1985.
- CRUZ, C. D.; FERREIR, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Viçosa: UFV, 2020.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento de genético**. Viçosa-MG: UFV, v. 1, 514 p., 2012.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: version II. In: KORBAN, S. S. **Plant Molecular Biology Reporter**. 1 ed. Nova York, v. 1, p. 19-21, 1983.
- GESTEIRA, G. S. **Seleção de linhagens de soja precoce para produtividade e qualidade de grãos**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2017.
- HAMID, M. A. A.; MANDOUR, A. E.; ISMAIL, T. A. I.; AL-ZOHAIRY, A. M. Detection of genetic diversity in different soybean (*Glycine max* L.) cultivars using seed storage protein profiles and RAPD-PCR analysis. **Zagazig J. Agric. Res.**, v. 44, n.3, 2017.
- KACHARE, S.; TIWARI, S.; TRIPATHI, N.; THAKUR, V. V. Assessment of Genetic Diversity of Soybean (*Glycine max*) Genotypes Using Qualitative Traits and Microsatellite Markers. **Agric. Res.**, v. 9, n. 1, p. 23-34, 2020.

LORINI, I. (Ed.). **Qualidade de sementes e grãos comerciais de soja no Brasil – safra 2017/2018**. (Documentos, 422). Londrina: Embrapa Soja, 2019.

MACHADO, B. Q. V.; NOGUEIRA, A. P. O.; HAMAWAKI, O. T.; JORGE, G. L.; REZENDE, G. F.; GLASENAPP, J. S.; HAMAWAKI, R. L.; HAMAWAKI, C. D. L. Agronomic performance and genetic diversity among lines and soybean cultivars. **Biosci. J.**, v. 33, n. 6, p. 1419-1430, 2017.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Resourcers**, Baltimore, v. 7, n. 2, p. 209-220, 1967.

MOURA, N. B.; CARVALHO, I. R.; HUTRA, D. J.; FURLAN, R. D. P.; MALLMANN, G.; STASIAK, G.; MACIEL, D. G.; MELO, W. L. F.; LOPES, P. F.; LAUTENCHLEGER, F. Quali-quantitative genetic dissimilarity of soybean. **Functional Plant Breeding Journal**, v. 3, n. 1, 2021.

PÍPOLO, A. E.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; DEBIASI, H.; MANDARINO, J. M. G. **Teores de óleo e proteína em soja: fatores envolvidos e qualidade para a indústria**. (Circular Técnico, 86). Londrina, PR: Embrapa Soja, 2015.

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

SANTOS, E. R.; BARROS, H. B.; CAPONE, A.; MELO, A. V.; CELLA, A. J.; SANTOS, W. R. Divergência genética entre genótipos de soja com base na qualidade de sementes. **Revista Agrárias**, Recife, v. 7, n. 2, p. 247-254, 2012.

SEIXAS, C. D. S.; NEUMAIER, N.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; LEITE, R. M. V. B. C. (Ed.). **Tecnologias de produção da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 347 p., 2020.

SULISTYO, A.; INDRIANI, F. C.; MEJAYA, M. J.; SUGIHARTO, A. N.; AGRANOFF, J. Genetic diversity of Indoneasian soybean (*Glycine max* L. Merrill) germplasm based on morphological and microsatellite markers. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2019.

ULLAH, A.; AKRAM, Z.; MALIK, S. I.; KHAN, K. S. U. Assessment of phenotypic and molecular diversity in soybean [*Glycine max* L. Merr.] germplasm using morpho-biochemical attributes and SSR markers. **Genet Resour Crop Evol**, p. 1-21, 2021.

VIEIRA, E. S. N.; PINHO, E. V. R. V.; CARVALHO, M. G. G.; SILVA, P. A. Caracterização de cultivares de soja por descritores morfológicos e marcadores bioquímicos de proteínas e enzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, nº 1, p. 086-094, 2009.

VILLELA, O. T. **Diversidade fenotípica e molecular de cultivares brasileiras de soja portadoras de gene RR**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP, 2013.

ANEXOS

ANEXO I

Marcadores RAPD e suas sequências.

Primer	Sequência (5' - 3')	Primer	Sequência (5'-3')
OPA-01	CAGGCCCTTC	OPB-03	CATCCCCCTG
OPA-02	TGCCGAGCTG	OPB-04	GGACTGGAGT
OPA-03	AGTCAGCCAC	OPB-09	TGGGGGACTC
OPA-04	AATCGGGCTG	OPB-10	CTGCTGGGAC
OPA-05	AGGGGTCTTG	OPB-11	GTAGACCCGT
OPA-06	GGTCCCTGAC	OPB-16	TTTGCCCGGA
OPA-08	GTGACGTAGG	OPB-17	AGGGAACGAG
OPA-09	GGGTAACGCC	OPB-18	CCACAGCAGT
OPA-10	GTGATCGCAG	OPB-19	ACCCCCGAAG
OPA-11	CAATCGCCGT	OPB-20	GGACCCTTAC
OPA-12	TCGGCGATAG	OPC-01	TTCGAGCCAG
OPA-13	CAGCACCCAC	OPC-02	GTGAGGCGTC
OPA-14	TCTGTGCTGG	OPC-03	GGGGGTCTTT
OPA-15	TTCCGAACCC	OPC-07	GTCCCGACGA
OPA-17	GACCGCTTGT	OPC-10	TGTCTGGGTG
OPA-18	AGGTGACCGT	OPC-11	AAAGCTGCGG
OPA-19	CAAACGTCGG	OPC-14	TGCGTGCTTG
OPA-20	GTTGCGATCC	OPC-15	GACGGATCAG
OPAL-13	GAATGGCACC	OPC-16	CACACTCCAG
OPB-02	TGATCCCTGG		

ANEXO II

Marcadores microssatélites, sua sequências e respectivo grupo de ligação (GL).

Primers	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	GL
Satt012	GCAATTAGTTTTAAAATGTTTC	AGAATAGAGCCTACATATAATCATA	G
Satt251	CCTCCACCCCCTTCCCACCCAAA	GGTGATATCGCGCTAAAATTA	B1
Satt270	TGTGATGCCCTTTTCT	GCGCAGTGCATGGTTTTCTCA	I
Satt390	AGTGGCTGATAAAAAAATACTCA	ATAATCGCGGCACAATAATTC	A2
Satt150	AAGCTTGAGGTTATTCGAAAATGAC	TGCCATCAGGTTGTGTAAGTGT	M
Satt338	GCGCCCAAGTATTATGAGATATTTGAT	GCGATAATTTTAAAAGTGGACCA	C1
Satt339	TAATATGCTTTAAGTGGTGTGGTTATG	GTTAAGCAGTTCCTCTCATCACG	N
Satt471	GCGCCCAAAGTATCTAGTAATTCTT	GGGCTATCAAATTGACTAAAGCCAAA	A1
Satt384	TGGGGGTCAATTTTAATTTGTGC	ATTTCCCTTTCACCCACCTCTGTTT	E
Satt280	GCGGAATCTGCTTATTCATTGTGTG	GCGCCATGCTGTAACACGTC AAT	J
Satt513	GCGCATCACAAGTTTTATAGATGCTGA	GAGGTCTAGTGCTTTGGTAAGGTT	L
Satt553	GCGCCTTCTGTTCCATCACAGAT	GCGGCTTGTGAAACTGGCTGATTAT	E
Satt222	GCGTGTTTTGTGAAAATAATAATTAAGATG	GCGCCACAAGTAACTAATGTAATAGGTGTT	H
Satt225	AAAAATGTGTTAGAGCTTGTGTTGTTA	GCCACACTATTCCAGCCACTAC	A1
Satt239	GCGCCAAAAAATGAATCACAAT	GCGAACACAATCAACATCCTTGAAC	I
Satt241	GCGCTTGGTCTAAGAAAAC TTTTGGT	GGGGGTTTTATCTCTTAAATGTG	O
Satt302	GCGAACTGTAGTTTACTAAAAATAAGTG	GCGGACTGAATTAATATTGGTGTG AATT	H
Satt342	GGTGCAAGGGAAAATGGAAATAA	GATACAACGTCGTGCTACTATCCA AATA	D1a
Satt345	CCCCTATTTCAAGAGAATAAGGAA	CCATGCTCTACATCTTCATCATC	O
Satt369	AACATCCAAAGAAATGTGTTCACAA	GCGAGTTCGAATTTCTTTTCAAGT	E
Satt052	GAATAAAATTAGGATAAGTGATAAG	ACAGAAAAAAGAAAATGTCA	H
Satt200	GCGATAAATGGTTAATGTAGATAA	GCGAAAGGACAGATAGAAAGAGA	A1
Satt476	TTTGCTGATTAAAAAAACAAAAACTG	TTGTTAGAATGGGGACTACTTCACTA	C1
Satt520	GCGGTGTGCAAGAGTGACA	GCGCATTGGACTTTCTA	C2
Satt137	TAACCAAAGAGTCCCAATAAA	CCTCAAATTAACCTTGTCTCAC	K

Satt146	AAGGGATCCCTCAACTGACTG	GTGGTGGTGGTGAAAACCTATTAGAA	F
Satt358	GCGGCGCTTTATGTAAACAATACGATTT	GCGAGTAAAAGCAGAGTGCGGAGTA	O
Satt567	GGCTAACCCGCTCTATGT	GGCCATGCACCTGCTACT	M
Satt076	TAATCGAGATTTAATAGAAAACA	TGGATGGACATTTTCAG	L
Satt386	GCGGATGATTTTTATAGAATAGATAAT	CTTCGTTGATACCTCAGTAGAGTACAAA	D2
Satt475	AAATGCAACTTACACAACCTTTAT	TGCTTGCTTCAATTTGGATGAGTG	K
Satt509	GCGCTACCGTGTGGTGGTGTGCTACCT	GCGCAAGTGGCCAGCTCATCTATT	B1
Satt009	TGGTAAAGGAGGAACTT	AGAATGTGCTGATGACA	H
Sct_034	AATTCTCACTCTCACAACCTC	CCATGGAATAGTTGGGT	B2
Sat_085	GGTTTTAGATCCTTAAATTTGT	GGGAAGCAAGTAGCT	C1
Satt162	GGGAAGAAGTATATGCTACATCAA	GGGAAGAAGTATATGCTACATCAA	I
Satt168	CGCTTGCCCAAAAATTAATAGTA	CCATTCTCCAACCTCAATCTTATAT	B2
Satt277	GGTGGTGGCGGGTTACTATTACT	CCACGCTTCAGTTGATTCTTACA	C2
Satt542	CACCAGCACAGAACAATCATT	CACGGTCTAACCTTTCCTTCTA	D1b