

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia**  
**de Sementes**



**Dissertação**

**Mapeamento de caracteres do tegumento da semente de soja e  
análise *in silico* dos marcadores microssatélites**

**Fernando Augusto Henning**

**Pelotas, 2007**

FERNANDO AUGUSTO HENNING

**Mapeamento de caracteres do tegumento da semente de soja e  
análise *in silico* dos marcadores microssatélites**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Sementes.

Orientador: Paulo Dejalma Zimmer

Pelotas, 2007

**Dados de catalogação na fonte:**  
( Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744 )

H517m Henning, Fernando Augusto  
Mapeamento de caracteres do tegumento da semente  
de soja e análise in silico dos marcadores  
microssatélites / Fernando Augusto Henning. - Pelotas,  
2008.

58f. : il.

Dissertação ( Mestrado ) –Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes.  
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade  
Federal de Pelotas. - Pelotas, 2008, Paulo Dejalma  
Zimmer, Orientador.

1.Glycine max 2. Marcadores moleculares 3.  
Tegumento preto I Zimmer, Paulo Dejalma

**Banca Examinadora:**

Prof. Paulo Dejalma Zimmer Dr.

Prof. Antônio Carlos Souza Albuquerque Barros Dr.

Prof. Edgar Ricardo Shöffel Dr.

Prof. Dario Munt de Moraes Dr.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Ademar e Sueli Henning,  
meu irmão, Mário Henning, pelo apoio e  
presença constante, apesar da distância  
física.

A minha namorada, Liliane Mertz, que  
desde o primeiro momento, tornou-se  
minha inspiração e verdadeiro apoio.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À Deus acima de tudo.

À minha namorada, um dos melhores acontecimentos da minha vida, que sempre me apóia e se dedica para termos uma relação de amizade e amor.

À minha família, meus pais, meus verdadeiros mestres, que sempre me apoiaram e de uma forma simples e pura me mostram o verdadeiro sentido de amar. Ao meu irmão Mário, melhor amigo e companheiro que qualquer irmão poderia desejar, demonstrando, que não apenas com palavras, podemos apoiar todos que amamos.

Ao meu tio Ademir Henning, pela amizade, incentivos e grandes palavras que me levaram ao fascínio pela pesquisa.

Ao professor Paulo Dejalma Zimmer, pela amizade, conselhos e orientação.

Ao professor Odir Dellagostin, que abrindo as portas do “mundo molecular”, foi vital para a construção deste trabalho.

Ao amigo Gaspar Malone, por toda ajuda e ensinamentos passados.

Aos colegas do laboratório de BioSementes, pelo auxílio na execução do trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, que nos passaram ensinamentos fundamentais durante o curso.

Ao amigo Luciano Carlos da Maia (Paulista), pela ajuda prestada na construção do capítulo dois e pelos ensinamentos passados.

Ao colega Eduardo Alano Vieira (EMBRAPA-Cerrados), pela ajuda com a parte estatística e montagem dos mapas.

Ao departamento de Genômica e Fitomelhoramento pela concessão do espaço físico e equipamentos necessários para a execução do trabalho.

A todos da equipe de biotecnologia da empresa COODETEC, pela amigável parceria e ajuda despendida para com este trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes e ao secretário pela amizade e convivência.

A CAPES, CNPq e a FAPERGS, pela concessão da bolsa de estudos e pelos recursos financeiros.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, em especial aos amigos Marcus Teplizky e Fabrício Peske.

## **Mapeamento de caracteres do tegumento da semente de soja e análise *in silico* dos marcadores microssatélites**

Autor: Fernando Augusto Henning

Orientador: Paulo Dejalma Zimmer

### **RESUMO**

A utilização de sementes de qualidade é preponderante para se obter sucesso produtivo em uma lavoura. Diversos são os fatores que influenciam na qualidade das sementes, sendo que dentre estes podem-se citar as flutuações na umidade das sementes e até mesmo a utilização de técnicas inadequadas na colheita. O tegumento das sementes de soja é o responsável pela proteção do embrião, logo, quanto maior sua resistência a fatores que irão levar a perda de qualidade, menores serão os prejuízos para toda a cadeia produtiva de sementes de soja. A introdução de caracteres de maior resistência do tegumento da semente de soja está relacionada à característica da permeabilidade do tegumento. Diversos estudos demonstram existir genótipos de soja com diferentes características de permeabilidade. Baseado nestas informações realizou-se o cruzamento entre a cultivar comercial CD202 (tegumento amarelo e permeável) com uma linhagem TP (tegumento preto e semi-permeável). Na população gerada pelo cruzamento, desenvolveu-se este trabalho com os seguintes objetivos: i) Construir um mapa genético do tegumento da semente de soja utilizando marcadores microssatélites, RAPD e AFLP; ii) Relacionar os marcadores microssatélites utilizados na construção do mapa genético do tegumento da soja, com as possíveis proteínas codificados pelas seqüências ancoradas por estes marcadores no banco de ESTs da soja. Para a construção do mapa genético do tegumento da soja foram testados 600 *primers* microssatélites, 50 RAPD e 64 AFLP. Os marcadores selecionados como

polimórficos, foram submetidos à análise de Qui-quadrado e agrupados em grupos de ligação utilizando o programa MapMaker. O alinhamento entre as seqüências dos microssatélites com o banco de dados de ESTs foi feito via análises *in silico* utilizando-se o programa BLAST. Do total de marcadores testados, foram utilizados na construção do mapa 20 marcadores microssatélites, 2 RAPD e 11 AFLP, os quais foram eficientes na formação de 13 grupos de ligação. Dentre os 20 marcadores microssatélites selecionados, 4 apresentaram homologia com seqüências de ESTs depositadas no banco de dados da soja, sendo que algumas destas seqüências possuem relação indireta com a qualidade de sementes de soja.

Palavras chave: *Glycine Max*, marcadores moleculares, tegumento preto.

## **Genetic mapping of soybean seed and *in silico* analysis of the microsatellites markers**

Author: Fernando Augusto Henning

Adviser: Paulo Dejalma Zimmer

### **ABSTRACT**

The use of quality seeds is preponderant to obtain productive success in farming. Several are the factors that influence in the quality of seeds, and among these the floatations can be mentioned in the humidity of seeds and even the use of inadequate techniques in the crop. The coat of soybean seeds is the responsible for the protection of the embryo, therefore, more resistance to you factor that they will take the quality loss, minor will be the damages for the whole productive chain of soybean seeds. The introduction of characters of larger resistance of coat of soybean seed is related to the characteristic of the permeability of coat. Several studies demonstrate to exists soybean genotypes with different permeability characteristics. Based on these information took place the crossing among to cultivate commercial CD202 (yellow and permeable coat) with a lineage TP (black and semi-permeable coat). In the population generated by the crossing, grew this work with the following objectives: i) to Build a genetic map of the coat of soybean seed using markers microsatélites, RAPD and AFLP; ii) to Relate the markers microsatélites used in the construction of the genetic map of the coat of soybean, with the possible proteins codified by the sequences anchored by these markers in the bank of ESTs of the soybean. For the construction of the genetic map of the coat of soybean 600 *primers* microsatélites, 50 RAPD and 64 AFLP were tested. The markers selected as polimórficos, they were submitted to the analysis of Qui-square and contained in connection groups using the program MapMaker. The alignment among the

sequences of the microssatélites with the database of ESTs was made through analyses in silico being used the program BLAST. Of the total of tested markers, they were used in the construction of the map 20 markers microssatélites, 2 RAPD and 11 AFLP, which were efficient in the formation of 13 connection groups. Among the 20 markers selected microssatélites, 4 presented homology with sequences of ESTs deposited in the database of the soybean, and some of these sequences possess indirect relationship with the quality of soybean seeds.

Palavras chave: *Glycine max*, molecular markers, black seed coat.

## **LISTA DE FIGURAS**

### **Capítulo I**

Figura 1 – Mapa genético do tegumento da soja, construído com base em marcadores microssatélites, RAPD e AFLP utilizando plantas F2 (microssatélites e RAPD) e famílias F3 (AFLP) oriunda do cruzamento entre os genótipos CD202 e TP. Aonde cM é a distância entre marcadores dada em centiMorgans; GL é o Grupo de ligação (Cromossomo + marcadores); M é a denominação dada ao marcador.....

32

### **Capítulo II**

Figura 1 – Marcadores microssatélites do mapa genético do tegumento da soja, utilizados para a busca no banco de ESTs. Aonde cM é a distância entre marcadores dada em centiMorgans; GL é o Grupo de ligação (Cromossomo + marcadores); Marca é a denominação dada ao marcador.....

41

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

Tabela 1 – Número de sementes F2, obtidas da autofecundação de plantas F1...	20
Tabela 2 – Combinações de <i>primers</i> testados nas reações de amplificação seletiva na população de 146 indivíduos, aonde M é <i>primer</i> complementar ao sítio de restrição da enzima <i>Mse</i> I e E é <i>primer</i> complementar ao sítio de restrição da enzima <i>EcoR</i> I.....	24
Tabela 3 – Programação utilizada na reação de amplificação seletiva no termociclador. Aonde: (°C) é a temperatura em graus celsius; (Tempo) é dado em segundos e refere-se a cada ciclo.....	25
Tabela 4 - Combinações de <i>primers</i> utilizados e número de marcadores polimórficos gerados, a partir da avaliação entre os genitores (TP e CD202).....	30

### Capítulo II

Tabela 1 – Seqüências dos <i>primers</i> utilizados como marcadores no mapa genético do tegumento da soja.....	38
Tabela 2 - Marcadores microssatélites que apresentaram homologia com seqüências de DNA e/ou Proteínas depositadas no banco de dados TIGR.....	42

## SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
Lista de Figuras.....	X
Lista de Tabelas.....	XI
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
CAPÍTULO I - Mapa genético para caracteres do tegumento da semente de soja.....	03
1 – INTRODUÇÃO.....	04
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	08
2.1 - A cultura da Soja: Ciência e Tecnologia de Sementes X Biotecnologia.....	08
2.2 – Marcadores Moleculares.....	10
2.2.1 – Microssatélites ou SSR (Polimorfismo de <i>locus</i> de seqüências simples repetidas).....	13
2.2.2 – RAPD (Amplificação Aleatória do Polimorfismo de DNA).....	14
2.2.3 - AFLP (Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados).....	15
2.3 – Mapas Genéticos.....	16
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 – Obtenção do Material Genético.....	19
3.1.1 – Material genético para as técnicas de microssatélites e RAPD.....	19
3.1.2 – Material genético para a técnica de AFLP.....	20
3.1.3 – Caracterização fenotípica.....	20
3.2 - Material vegetal coletado das plantas F3.....	20
3.3 - Extração de DNA genômico das famílias F3.....	21
3.4 - Padronização da concentração do DNA das famílias F3.....	21
3.5 - Reações de AFLP.....	22

3.5.1 – Reação de digestão do DNA.....	22
3.5.2 – Ligação de adaptadores.....	22
3.5.3 - Pré-amplificação.....	23
3.5.4 – Seleção das combinações de <i>primers</i> .....	23
3.5.5 – Amplificação seletiva.....	24
3.5.6 – Preparo dos géis e condições de eletroforese.....	25
3.5.7 – Obtenção dos marcadores para confecção do mapa.....	27
3.5.8 – Análise dos marcadores para confecção do mapa.....	28
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 - Mapa genético com marcadores microssatélites , RAPD e AFLP.....	29
5 – CONCLUSÕES.....	33
CAPITULO II – Análise <i>in silico</i> dos marcadores microssatélites.....	34
6 – INTRODUÇÃO.....	35
7 – MATERIAL E MÉTODOS.....	38
7.1 – Busca das seqüências dos marcadores.....	38
7.2 – Alinhamento das seqüências.....	39
8 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
9 – CONCLUSÕES.....	46
CONCLUSÕES GERAIS.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

## **INTRODUÇÃO GERAL**

O sucesso da obtenção de altas produtividades de soja depende da utilização de sementes de qualidade. O uso de sementes de soja com vigor comprometido pode provocar falhas no estande o que resultará na redução da produtividade. Em muitas situações, haverá a necessidade de ressemeadura, prática associada com prejuízos referentes ao aumento do custo de produção e menor produtividade.

Em face disto, a Tecnologia de Sementes ao longo de todo o período de produção das sementes de soja, vêm através de inúmeros estudos, identificando, em quais pontos pode-se aperfeiçoar o manejo para reduzir o fator deterioração de sementes.

Diversos fatores foram identificados como críticos no processo produtivo das sementes de soja, sendo que estes podem ocorrer no campo, durante a colheita e durante todas as demais etapas, como a secagem, o beneficiamento, o armazenamento, o transporte e a semeadura. Tais fatores abrangem extremos de temperatura durante a maturação, flutuações das condições de umidade ambiente, incluindo secas, deficiências na nutrição das plantas, ocorrência de insetos, além da adoção de técnicas inadequadas de colheita, secagem e armazenamento.

Neste contexto, a Tecnologia de Sementes atuou de maneira imprenscidível, lançando tecnologias, como por exemplo, definição do período adequado de colheita para diferentes culturas e até mesmo no aprimoramento de equipamentos envolvidos na semeadura, colheita, secagem, beneficiamento e armazenamento.

Alheio a estes avanços tecnológicos, existem variedades extremamente produtivas, produzindo sementes altamente suscetíveis a danos mecânicos e à deterioração por umidade, dificultando a produção de sementes de alta qualidade. Por outro lado, existem genótipos altamente tolerantes à deterioração, evidenciando contrastes fenotípicos e variabilidade genética para o caráter dentro da espécie. Estudos conduzidos por Mertz (2007) demonstraram que sementes com tegumento permeável apresentam menor vigor quando comparadas as sementes com tegumento semi-permeável.

Esses dados sugerem o desenvolvimento de programas de melhoramento genético que priorizem a qualidade das sementes, onde se destacam os atributos relacionados ao tegumento das sementes de soja.

O trabalho foi dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo abordou a construção do mapa genético do tegumento da soja com marcadores moleculares microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeats*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism*). O segundo capítulo buscou relacionar os marcadores microssatélites utilizados na construção do mapa genético do tegumento da soja, com as possíveis proteínas/enzimas codificados pelas seqüências ancoradas por estes marcadores, utilizando para isso, ferramentas da bioinformática.

## **CAPÍTULO I**

**Mapa genético para caracteres do tegumento da semente de soja**

## 1 - INTRODUÇÃO

Desde o início do cultivo da soja no Brasil, grandes avanços tecnológicos foram obtidos pela pesquisa, tanto para a melhoria do complexo ambiental, como também para a melhoria do potencial genético das cultivares.

Esses avanços refletiram na evolução da produtividade média da soja no país, que era de 1.748 Kg x ha<sup>-1</sup> na safra de 1976/77 e 2.755 Kg x ha<sup>-1</sup> na safra 2006/07 (CONAB, 2007). Este aumento é fruto dos grandes investimentos públicos e privados, que estão sendo, cada vez mais, disponibilizados aos produtores, e refletem a cada ano o aumento na produtividade.

Além destes investimentos, parcerias entre o melhoramento genético e outras áreas de pesquisa como, por exemplo, biotecnologia, fisiologia, fitopatologia e sementes, condizem ao aumento da produtividade dos genótipos, para que sejam competitivos no mercado como novas cultivares.

Para se obter a máxima produtividade das cultivares é imprescindível a utilização de sementes com boa qualidade fisiológica, não esquecendo dos atributos físicos, sanitários e genéticos.

O comprometimento da qualidade fisiológica das sementes pode ser relacionado às características do tegumento das sementes (MERTZ, 2007). Sendo que a longevidade e o potencial de deterioração no campo têm sido relacionados ao grau de permeabilidade do mesmo, assim como a suscetibilidade a danos mecânicos estar associada ao seu teor de lignina (SOUZA & MARCOS-FILHO, 2001). Algumas cultivares de soja e outras espécies da família *Fabaceae*, possuem sementes com tegumentos semi-permeáveis, as quais podem proteger contra a deterioração e melhorar as qualidades agronômicas sob certas condições (MA et al., 2004).

O tegumento da soja é o principal modulador das interações entre as estruturas internas das sementes e o ambiente externo, tendo como principais funções: preservação da integridade das partes internas da semente, proteção do embrião e tecidos de reserva contra danos mecânicos, barreira à entrada de microorganismos e insetos, regulação das trocas gasosas entre a semente e o meio, e, controle da velocidade de hidratação da semente (PESKE & PEREIRA, 1983; POPINIGIS, 1985; CARVALHO & NACAGAWA, 1988; SOUZA & MARCOS-FILHO, 2001). Segundo FRANÇA NETO et al. (1994), além das propriedades do tegumento das sementes de soja, a permeabilidade da vagem, a resistência a fungos, o tamanho da semente e a permeabilidade da membrana celular do tegumento, também podem influenciar na qualidade fisiológica.

O tegumento das sementes de soja pode ser permeável ou semi-permeável à água. Tegumentos permeáveis facilitam a embebição, enquanto tegumentos semi-permeável restringem, em diferentes graus, a embebição. Em estudos recentes com soja, Ma et al. (2004) relataram que a cutícula da camada paliçádica do tegumento é fator determinante na permeabilidade do mesmo, sendo que a cutícula permeável é mecanicamente frágil, desenvolvendo rachaduras durante a embebição, ou até mesmo, durante as diferentes etapas do processo de produção, beneficiamento e armazenamento das sementes, enquanto que o tegumento semi-permeável é mecanicamente mais resistente, não sofrendo rachaduras em condições normais.

No entanto, trabalhos conduzidos por Mertz (2007), sugerem a existência de outras diferenças que não à cutícula, entre a estrutura dos tegumentos de soja com características de permeabilidade contrastantes, como por exemplo, a espessura das camadas da epiderme e hipoderme, a presença de pigmentos e o formato e organização das células também estariam relacionadas à permeabilidade.

Atualmente diversas empresas, além de adotarem todas as tecnologias até hoje geradas para se diminuir a perda da qualidade fisiológica das sementes durante o processo produtivo, tem introduzido em seus programas de melhoramento genético características que contribuem para a manutenção da qualidade fisiológica das sementes de soja, como as relacionadas ao

tegumento (FRANÇA NETO, 2006<sup>1</sup>).

Umas das principais técnicas aplicadas em um programa de melhoramento para promover o ganho genético de caracteres qualitativos é a seleção assistida por marcadores moleculares (SAMM) (GUIMARÃES & MOREIRA, 1999). Os marcadores moleculares podem “sinalizar” a presença de segmentos de DNA que diferenciam indivíduos de uma população segregante quanto à presença do caráter desejado. Entretanto, para que a SAMM seja implementada, é preciso que o programa de melhoramento genético disponha de *primers* específicos para o caráter de interesse. Portanto, previamente à SAMM é fundamental a geração de mapas genéticos voltados à identificação de marcadores moleculares ligados ao caráter de interesse. Para a geração de mapas genéticos, diversas técnicas podem ser utilizadas em uma população segregante. Dentre elas, pode se destacar as técnicas de microssatélites (LITT & LUTY, 1989; WEBER & MAY, 1989), AFLP (ZABEAU 1993; VOS et al., 1995) e RAPD (WILLIANS et al., 1990; WELSH & MCCLELLAND, 1990).

Uma das primeiras técnicas utilizadas no mapeamento de caracteres de interesse foi o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), baseada em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a técnica também foi empregada para estudos de identificação de raças, hibridização inter e intra-específica e em estudos de variação gênica entre populações aparentadas (BORÉM, 2006). Dentre as principais vantagens da técnica, está o baixo custo de aquisição dos *primers*, a disponibilidade de um grande número de *primers*, o fato dos *primers* serem universais, o baixo custo e a velocidade na obtenção dos resultados. Por outro lado, como desvantagens, a técnica possui problemas de repetibilidade entre laboratórios e é dominante, não permitindo diferenciar genótipos heterozigotos (CAIXETA et al., 2006).

Outro tipo de marcador utilizado para a construção de mapas genéticos são os microssatélites e/ou SSR (*Single Sequence Repeats*), também baseados em PCR, os quais permitem uma separação de indivíduos aparentados, e aplicações em técnicas avançadas como no seqüenciamento de fragmentos e na prospecção de genes, através do uso de pares de *primers* que amplificam seqüências retidas na reação de PCR.

---

<sup>1</sup> Comunicação pessoal.

Os marcadores AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism*) permitem a obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos pelo genoma. O ensaio combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com a velocidade e praticidade de detecção do polimorfismo via PCR.

O objetivo deste primeiro capítulo do trabalho foi construir um mapa genético utilizando marcadores microssatélites, RAPD e AFLP na população de soja obtida do cruzamento dos genótipos CD202 ( tegumento permeável) e o TP ( tegumento semi-permeável).

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - A cultura da Soja: Ciência e Tecnologia de Sementes X Biotecnologia

A soja é a principal “oleaginosa” cultivada no mundo. No Brasil, a cadeia produtiva da soja participa de 20% do PIB (Produto Interno Bruto) do Agronegócio, correspondendo a mais de U\$S 35 bilhões ao ano, demonstrando a importância econômica deste produto, que ainda apresenta significativa evolução da produtividade média nos principais estados produtores de soja (CONAB, 2007).

Para a máxima produtividade das cultivares é imprescindível a utilização de sementes com boa qualidade. No caso da soja, as sementes são extremamente problemáticas em termos de qualidade fisiológica apresentando-se altamente susceptíveis as condições do meio ambiente, desde a época da semeadura até a colheita (BRACCINI et al., 1997).

Diversos são os fatores que afetam a qualidade da semente da soja, sendo esta, determinada por fatores genéticos, pelas condições climáticas nas fases de desenvolvimento e de maturação das sementes, pelas técnicas utilizadas durante a colheita, secagem, beneficiamento, bem como pelas condições de umidade e de temperatura durante o armazenamento, transporte e semeadura. No campo, problemas relativos à deterioração por umidade, também conhecidos por deterioração de campo, podem causar acentuadas reduções de qualidade, podendo ser apontada como uma das principais causas da deterioração das sementes (FRANÇA NETO et al., 2000).

A exposição de sementes de soja a ciclos alternados de elevada e baixa umidade antes da colheita, devido à ocorrência de chuvas freqüentes, ou às flutuações diárias de umidade relativa do ar, resulta na deterioração por

umidade, a qual pode ser apontada como a principal causa da baixa qualidade das sementes (FRANÇA NETO & HENNING, 1982).

A deterioração por umidade é desencadeada por um processo específico de alterações físicas. As sementes de soja, sendo higroscópicas, têm o seu grau de umidade condicionado pelas condições de umidade do ambiente. As sucessivas expansões e contrações do volume das sementes ocasionam a formação de rugas no tegumento, na região oposta ao hilo. Além disso, ocorre o cansaço físico dos tecidos, o que pode resultar em ruptura do tegumento e dos tecidos embrionários, comprometendo o desempenho das membranas aos níveis celular e sub-cellular. Organelas como as mitocôndrias são particularmente afetadas por tal processo, dificultando a respiração de manutenção e havendo menor produção de energia (ATP) para a germinação. Além das consequências diretas na qualidade das sementes, a deterioração por umidade também pode elevar o índice de danos mecânicos na colheita, uma vez que sementes deterioradas são extremamente vulneráveis aos impactos mecânicos (FRANÇA NETO et al., 2000).

Uma característica que tem sido avaliada pelos melhoristas de soja, visando o incremento da qualidade das sementes, é a semi-permeabilidade do seu tegumento, refletindo em maior resistência mecânica e maior controle nas trocas gasosas. A semi-permeabilidade do tegumento reduz o efeito das flutuações de umidade do ambiente sobre a semente, principalmente nas fases de maturação e pré-colheita, mas também durante o armazenamento, tornando, portanto, as sementes menos suscetíveis à deterioração. A menor incidência de patógenos transmitidos por sementes tem sido relatada em linhagens com tegumento semi-permeável. Outras vantagens resultantes de tal característica são: maior potencial de armazenamento; maior resistência aos danos mecânicos durante a colheita; e menor índice de ocorrência de danos causados por percevejos (FRANÇA NETO et al., 2000).

Segundo Souza & Marcos Filho (2001), a longevidade e o potencial de deterioração no campo têm sido relacionados ao grau de permeabilidade do tegumento, assim como a suscetibilidade a danos mecânicos está associada ao seu teor de lignina.

O tegumento semi-permeável, é uma característica muito importante no que concerne a deterioração de campo, pois ao causar uma redução na absorção de água pelas sementes, estas podem superar melhor as condições adversas (PESKE & PEREIRA, 1983).

O sucesso da cadeia produtiva da soja depende da utilização de cultivares adequadas. Além de possuir elevado potencial de produtividade, essas cultivares devem produzir sementes de alta qualidade, o que assegurará a obtenção de estandes adequados. Nesse caso, torna-se necessário o estabelecimento ou a manutenção de programas de melhoramento genético, onde o fator qualidade de sementes apresenta alta prioridade.

## 2.2 - Marcadores Moleculares

Um segmento específico de DNA, cuja seqüência básica difere para diferentes genótipos e, portanto, permite diferenciá-los, se constitui num marcador molecular – marcador de DNA (MALONE & ZIMMER, 2005). Um marcador molecular é definido como qualquer segmento molecular oriundo de um gene expresso ou de um fragmento específico de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Milach (1998a) descreve que marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente.

Os primeiros marcadores moleculares “modernos” foram as isoenzimas, seguidas cronologicamente pelo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (GRODZICKER et al., 1974; SOLOMON & BODNER, 1979; BOTSTEIN et al., 1980), pelo RAPD (WILLIANS et al., 1990; WELSH & MCCLELLAND, 1990), por microssatélites (LITT & LUTY, 1989; TAUTZ, 1989; WEBER & MAY 1989) e pelo AFLP (ZABEAU, 1993; VOS et al., 1995). Esses últimos, os marcadores mais usados atualmente.

Antes do início da utilização de técnicas moleculares para a detecção de variabilidade genética com base na seqüência de DNA, os marcadores morfológicos eram muito utilizados para estudos genéticos tais como ligação gênica e, também, para a construção de mapas genéticos. No entanto, a probabilidade de associações significativas entre marcadores morfológicos e

caracteres agronomicamente importantes era reduzida, devido ao pequeno número desses marcadores em uma mesma linhagem, tornando seu uso limitado (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; GUIMARÃES & MOREIRA, 1999).

São muitas as aplicações dos marcadores moleculares em plantas, sendo principalmente utilizados em análises de diversidade genética, na caracterização de germoplasma e no mapeamento de genes e QTLs (*quantitative trait loci*) (LANDE & THOMPSON, 1990; WEBB et al., 1995; CHANG et al., 1996; CHANG et al., 1997; CONCIBIDO et al., 1997; THOMPSON & NELSON, 1998; MEKSEM et al., 1999; REYNA & SNELLER, 2001; YUAN et al., 2002; CORNELIOUS & SNELLER, 2002).

Geldermann (1975) propôs o termo *locos* controladores de caracteres quantitativos, de sigla QTL, que é a abreviatura inglesa de *quantitative trait loci*, o qual vem sendo adotado principalmente em estudos de mapeamento. Normalmente, não é possível determinar se o efeito detectado com o marcador é devido a um ou mais genes ligados que afetam o caráter. Por esta razão, o termo *loci* de caráter quantitativo (QTL) é usado para descrever a região do cromossomo que possui um ou mais genes influenciando na manifestação fenotípica desse caráter (BEARZOTI, 2000).

Com a utilização de tecnologias adequadas de marcadores moleculares é possível avaliar todas as regiões cromossômicas quanto aos seus efeitos na manifestação de caracteres quantitativos (STUBER et al., 1987), principalmente no que tange a disponibilidade e distribuição dos marcadores pelo genoma. O uso de marcadores moleculares para identificar QTLs que controlam caracteres quantitativos tornou-se um procedimento padrão em genética vegetal, tanto para a compreensão da base genética, quanto para sua aplicação em programas de melhoramento (BECKMANN & SOLLER, 1986; STUBER et al., 1992).

Para que os QTLs possam ser localizados e seus efeitos estimados, há necessidade do mapeamento do genoma e da determinação do quanto cada uma destas regiões contribuem para o caráter (PATERSON et al., 1991). Portanto, para a avaliação fenotípica do caráter é necessária a utilização do maior número de ambientes possíveis.

Federizzi (1998) enfatiza que a área de maior impacto dos marcadores moleculares no melhoramento vegetal será através do emprego da seleção assistida para identificação de genótipos superiores em populações segregantes. Entretanto, atualmente, a pequena disponibilidade de marcadores moleculares disponíveis para esse tipo de seleção não permite que esta possibilidade seja amplamente explorada.

O uso de marcadores moleculares na seleção de genótipos superiores poderá incrementar a eficiência no melhoramento de plantas, pois menor número de progêneres por combinação será necessário, bem como, menor número de gerações para a estabilização dos genótipos (BARBOSA NETO, 1998; FEDERIZZI, 1998).

Comumente, misturas varietais, ou contaminações genéticas, são identificadas com base em características observadas na semente, na plântula e, em alguns casos, com auxílio de eletroforese de proteínas da semente. Guimarães & Moreira (1999) sugerem que os marcadores moleculares possam ser utilizados para o controle da pureza genética de sementes híbridas ou de linhagens, pois discriminam a contribuição genética de cada genitor na sua descendência, tornando-se, desta forma, uma importante ferramenta na certificação ou fiscalização de sementes. Outra grande aplicação dos marcadores moleculares é para a caracterização de variedades, linhagens ou híbridos (*fingerprintings*) na defesa do direito de propriedade intelectual, sendo utilizada como prova legal em processos jurídicos nos países em que já vigoram as leis de proteção de cultivares (LPC) e leis de propriedade industrial (LPI).

Os marcadores moleculares ideais possuem elevado polimorfismo entre dois genótipos, herança codominante (capacidade de diferenciar genótipos homozigotos de heterozigotos em organismos diplóides), estão distribuídos em todo o genoma, são facilmente visualizados e estáveis no decorrer das gerações. É lógico que não há uma única classe de marcadores que atenda a todos estes critérios (MALONE & ZIMMER, 2005). A escolha deverá ser realizada de acordo com a tecnologia disponível e com as características da população e do caráter.

## 2.2.1 – Microssatélites ou SSR (Polimorfismo de *locus* de seqüências simples repetidas)

Uma das técnicas mais indicadas para estudar polimorfismos entre seqüências de DNA é SSR (*Single Sequence Repeats*) ou microssatélites (LITT & LUTY, 1989; WEBER & MAY, 1989). Essa técnica baseia-se no uso de pares de *primers* na reação de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) para detectar *loci* de seqüências repetitivas. Estas são constituídas de 1 a 5 nucleotídeos, variações que se repetem lado a lado no genoma de eucariotos, principalmente, nas plantas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A amplificação é feita utilizando *primers* específicos de 20 – 30 bases, complementares às seqüências que flanqueiam uma determinada seqüência repetitiva. Os segmentos amplificados a partir destes sítios de anelamento de *primers* apresentam um elevado polimorfismo, produto da presença de diferenças no número de elementos repetidos. Desta forma, cada seqüência repetitiva, independentemente do elemento repetitivo (CA, GC, TG, ATC), constitui-se num *locus* gênico altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo em relação a uma espécie. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo *locus* dentro da população (MALONE & ZIMMER, 2005).

O uso da técnica de microssatélite tem aumentado nos últimos anos, principalmente devido à construção de mapas genéticos (servem como base) e aos avanços obtidos no seqüenciamento automático, o que permitiu identificar as seqüências que flanqueiam os sítios repetitivos, para o desenho de *primers* complementares (MALONE & ZIMMER, 2005).

Como estes marcadores são co-dominantes, possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo. Devido a isto, toda e qualquer população segregante pode ser utilizada como população referência para estudos de ligação e mapeamento genético (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Em soja, vários grupos estão desenvolvendo marcadores e mapas genéticos baseados em microssatélites. Isto se deve não somente à grande expressão e valor comercial da cultura no mundo, mas também aos baixos níveis de diversidade genética ao nível de DNA no germoplasma cultivado, o

que tem tornado a construção de mapas genéticos, baseadas em outras técnicas, difícil e tediosa (KEIM et al., 1989).

Como outras vantagens, podem-se citar o elevado nível de polimorfismo detectável, permite uma separação precisa de indivíduos aparentados, e, além de serem polimórficos, os microssatélites requerem quantidades mínimas de DNA (BUSO et al., 2003).

A maior limitação da técnica de microssatélites é a grande quantidade de trabalho e custo para o desenvolvimento de *primers*.

### **2.2.2 – RAPD (Amplificação Aleatória do Polimorfismo de DNA)**

A metodologia RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIANS et al., 1990), que é a denominação mais utilizada, e AP-PCR (*Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction*) (WELSH & McCLELLAND, 1990) utiliza *primers* aleatórios de 10 nucleotídeos que são utilizados para amplificar regiões genômicas ao acaso (aleatoriamente). O produto da amplificação é separado em géis de agarose e as bandas coradas com brometo de etídio. As bandas geradas, de diferentes pesos moleculares, representam diferentes *loci* dentro do genoma. A técnica permite a utilização de dois ou mais *primers* dentro da mesma reação, permitindo assim, aumentar o número de bandas e obter maior quantidade de informação em cada reação (MALONE & ZIMMER, 2005).

A técnica RAPD pode detectar regiões de DNA altamente variáveis (5-10 *loci* por *primer*) e, embora venha sendo substituída por técnicas mais estáveis ainda é muito utilizada. Esta técnica foi à primeira técnica de marcadores moleculares, baseada em PCR, empregada para estudos de mapeamento genético, identificação de raças, estudos de hibridização inter e intra-específica e em estudos de variação gênica entre populações aparentadas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

As vantagens são a rapidez na obtenção dos resultados; o baixo custo; a não utilização de radioatividade (a visualização do DNA é feita utilizando coloração com brometo de etídio); baixo investimento em equipamentos; e, uma quantidade mínima de DNA é requerida para a análise. Como principal desvantagem, a técnica é altamente inconsistente na obtenção dos resultados,

pois apresenta baixa repetibilidade (CAMARGO, 2001). Parte dessa inconsistência é corrigida mediante a utilização de duas amostras de DNA do mesmo genótipo para cada reação, ou seja, a utilização de uma repetição (YANG et al., 1994).

### **2.2.3 - AFLP (Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados)**

A técnica do AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism*) foi desenvolvida por (ZABEAU et al., 1993; VOS et al., 1995) e vem sendo muito utilizada para a obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos em genomas de eucariotos e procariotos. A análise de AFLP é realizada em quatro etapas básicas: 1) clivagem do DNA genômico total com duas enzimas de restrição, sendo uma de corte raro e uma de corte freqüente; 2) ligação de adaptadores específicos aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem; 3) amplificação seletiva de uma fração dos fragmentos via PCR utilizando *primers* específicos para reconhecer seqüências nos adaptadores; e, 4) separação da sub-população de fragmentos em gel de alta resolução (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A análise AFLP vem sendo utilizada de forma crescente para finalidades de impressão digital genômica (*fingerprinting*), mapeamento genético localizado e construção de mapas genéticos, principalmente em espécies de plantas cultivadas que apresentam baixa taxa de polimorfismo de DNA (CAMARGO, 2001).

Duas desvantagens são apresentadas como as mais importantes em relação à técnica de AFLP: i) a necessidade de preparação das amostras para o trabalho, envolvendo as etapas de digestão, ligação de adaptadores e pré-amplificação; ii) o tempo requerido para a análise visual dos dados, quando não é feita de forma automatizada, mediante programas computacionais que realizam a avaliação de bandas sobre uma foto digitalizada do gel. No entanto, a reprodutibilidade da técnica AFLP é comparável à técnica RFLP, pois são praticamente insensíveis às condições de reação, embora requeiram DNA de boa qualidade para o processo de digestão pelas enzimas de restrição (MALONE & ZIMMER, 2005). Outra grande vantagem da técnica, que também

é uma vantagem da técnica de RAPD, é não ser necessária à construção de *primers* específicos para a espécie em estudo, ou seja, o mesmo *primer* pode funcionar para animais e para plantas.

### **2.3 - Mapas Genéticos**

Uma das grandes vantagens do uso de marcadores moleculares no melhoramento genético é o mapeamento de caracteres de interesse. Com os marcadores podem-se mapear tanto caracteres qualitativos quanto os caracteres quantitativos, sendo os últimos denominados QTL (PEREIRA & PEREIRA, 2006).

Um mapa genético é uma representação simplificada do genoma, onde a molécula de DNA de cada cromossomo é representada por marcas ordenadas e mais ou menos espaçadas. Para cada cromossomo é obtido um conjunto de marcas ligadas entre si. Esse conjunto é denominado de grupo de ligação. A ligação entre essas marcas baseia-se na hipótese de que a co-transmissão de dois marcadores reflete sua proximidade, uma vez que a probabilidade de ocorrer permutas genéticas entre dois marcadores é inversamente proporcional à proximidade física entre eles. Cada uma dessas marcas possui, então, um vínculo genético com a região cromossômica que ela representa. A determinação da ordem e da distância relativa entre as marcas (marcadores) de um mesmo grupo de ligação, constitui um dos principais objetivos do mapeamento genético (SILVA, 2002).

O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise de espécies, e potencialmente, no melhoramento de plantas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). A formação de mapas genéticos possibilita: a cobertura e análise completa de genomas; a decomposição de características genéticas complexas nos seus componentes mendelianos; a localização das regiões genômicas que controlam caracteres de interesse; a quantificação do efeito destas regiões nas características estudadas; e, a canalização das informações para utilização no melhoramento de plantas.

Para a elaboração de um mapa de ligação complexo, há um pré-requisito, que é a formação de um mapa primário, com marcadores moleculares facilmente identificáveis, distribuídos uniformemente no genoma. Para a elaboração do mapa genético, existem dois requisitos básicos: reprodução sexuada (variabilidade) e uma fonte de marcadores moleculares com comportamento mendeliano (MALONE & ZIMMER, 2005).

Para um marcador ser utilizado no mapeamento genético, ele deve ser polimórfico entre os indivíduos parentais e apresentar uma segregação mendeliana esperada na progênie. Marcadores cuja segregação é estatisticamente validada pelo teste de Qui-quadrado são agrupados e ordenados em cada grupo de ligação com base nas análises de segregação destes em uma população de mapeamento, por meio de pacotes computacionais apropriados como MapMaker (LANDER et al. 1987), JoinMap (STAM, 1993) e mais recentemente o GQMOL 2.1 (CRUZ & SHUSTER, 2004).

O primeiro passo, em geral, relaciona-se à escolha de cruzamentos de forma a maximizar a probabilidade de se detectar polimorfismos ao nível de DNA. Posteriormente, após a autofecundação da F1, a população segregante selecionada para mapeamento é genotipada por algumas centenas de marcadores moleculares, os quais devem ser selecionados em função do polimorfismo que detectam na população segregante. Uma matriz de dados é então gerada onde as linhas constituem os marcadores moleculares e as colunas, os diferentes indivíduos genotipados (ROCHA et al, 2003). Nesta população F2 todos os indivíduos devem ser fenotipados, ou seja, avaliar todas as características fenotípicas de interesse individualmente, o que servirá para posterior alocação no mapa.

O próximo passo envolve estimar a distância em unidades de recombinação entre os marcadores ligados, a qual não é uma distância física e sim reflete a freqüência de recombinação genética (*crossing over*). A distância genética entre os *loci* é medida em termos de freqüência de recombinação, que é a probabilidade de ocorrência de permuta genética entre dois marcadores. A distância de mapeamento, expressa em centiMorgans (cM), é calculada com base na freqüência de recombinação por meio de funções de mapeamento que corrigem as distorções entre a conversão das unidades. A precisão na medida

da distância genética é diretamente proporcional ao tamanho da população e ao número de marcadores analisados (GUIMARÃES, 1999; LANNES et al., 2004)

Depois de agrupados os diversos marcadores em grupos de ligação, e de posse das distâncias genéticas dois a dois, um mapa pode ser construído manualmente em um procedimento clássico denominado mapeamento de três pontos, onde os marcadores são ordenados sequencialmente com base nas distâncias dois a dois, aonde, se considerando três marcadores A, B,C, se A está ligado a B, e B está ligado a C, então A está ligado a C (BEARZOTI, 2000).

### **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1- Obtenção do Material Genético**

##### **3.1.1 – Material genético para as técnicas de microssatélites e RAPD**

Todas as etapas de produção do material vegetal foram realizadas na empresa COODETEC (Unidade Cascavel - PR). A população de mapeamento foi obtida através do cruzamento entre uma variedade comercial da empresa CD202 ( tegumento amarelo/permeável/susceptível a deterioração), com uma variedade crioula ( tegumento preto/semi-permeável/resistente a deterioração).

Desse cruzamento foram obtidas cinco sementes F1, as quais foram semeadas e autofecundadas dando origem à população F2. Das cinco sementes F1, apenas quatro germinaram resultando em uma população F2 de 146 indivíduos. As sementes F2, originadas das plantas F1 (Planta 01 e Planta 02) foram utilizadas para a construção do mapa genético com os marcadores microssatélites e RAPD. A população utilizada compreendia os dois genitores e mais 94 indivíduos (44 com origem da planta 01 e 50 indivíduos da planta 02). Abaixo (Tabela 1) estão identificadas as plantas F1 e o respectivo número de sementes obtidas a partir da sua autofecundação.

Tabela 1 – Número de sementes F2, obtidas da autofecundação de plantas F1.

Número da Planta F1	Número de sementes F2
Planta 00	38
Planta 01	46
Planta 02	51
Planta 03	09

### **3.1.2 – Material genético para a técnica de AFLP**

Oito sementes das famílias F3 descendentes das mesmas plantas F2 utilizadas para o estudo com microssatélite e RAPD foram semeadas no laboratório didático de Análise de Sementes, do Departamento de Fitotecnia da UFPel. As sementes (F3) foram semeadas dentro de bandejas, utilizando-se como substrato, solo, dando origem as plantas F3. Essa população de plantas F3 foi utilizada para a extração do DNA utilizado na técnica de AFLP.

As bandejas foram colocadas em germinador, propiciando assim, ambiente uniforme de temperatura e umidade. Após 14 dias, as plântulas já apresentavam a folha primária bem desenvolvida estando aptas para a coleta do material vegetal, o qual foi utilizado na extração do DNA.

### **3.1.3 – Caracterização fenotípica**

Nesta etapa foram avaliados, nas sementes F3, os caracteres cor do tegumento e cor do hilo. O tegumento foi classificado em amarelo, marrom e preto. O hilo, por sua vez, foi classificado em marrom e preto. Essa classificação foi feita de acordo com Martin & Brakley (1973). Os dados obtidos foram utilizados para a localização dos respectivos *loci* no mapa genético.

## **3.2 - Material vegetal coletado das plantas F3**

Discos foliares de todas as plantas de cada uma das famílias F3 foram coletados com auxílio de tubo eppendorf, até obter-se aproximadamente 0,2

gramas de tecido vegetal por família. Imediatamente após a coleta, o material vegetal foi colocado em gelo para manter os tecidos estáveis até a extração do DNA genômico.

### **3.3 - Extração de DNA genômico das famílias F3**

O DNA genômico foi extraído através do método Doyle e Doyle (1990) a partir das folhas jovens coletadas de cada uma das plantas F3. Esse método consistiu nas seguintes etapas:

Primeiramente acrescentou-se 400 $\mu$ L de tampão de extração [2,0mL de Tris-HCl 1M pH7,5 + 0,5mL de NaCl 5M + 0,5mL de EDTA (Ácido Etileno Diaminotetracético) 0,5M pH 8,0 + 0,5mL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 10% e completa com água Mili-Q para um volume de 10 mL] e com o auxílio de um bastão de vidro realizou-se mecanicamente a desestruturação do material vegetal. Incubou-se essa mistura por 30 min a 60°C. Em seguida adicionou-se 400 $\mu$ L de uma solução de Clorofórmio: Álcool Isoamílico (24:1, v/v) e agitou-se até formar uma solução homogênea. Centrifugou-se a temperatura ambiente por 10 min a 12.000 x g. Recuperou-se o sobrenadante (300 $\mu$ L) e transferiu-se para um novo tubo de 1,5mL. Adicionou-se 600 $\mu$ L de isopropanol gelado (-20°C) e homogeneizou-se. Centrifugou-se por 10 min a 10.000 x g. O sobrenadante foi eliminado e o *pellet* recuperado ( continha os ácidos nucléicos). Lavou-se o *pellet* com 1mL da solução de lavagem gelada durante 20 min. Centrifugou-se a temperatura ambiente por 10 min a 10.000 x g. O sobrenadante foi eliminado e o *pellet* foi seco à temperatura ambiente O último passo foi resuspender o *pellet* em 100 $\mu$ L de tampão TE a pH-8,0.

### **3.4 - Padronização da concentração do DNA das famílias F3**

A quantificação do DNA foi feita em gel de agarose onde as amostras de DNA da população foram comparadas com marcadores de concentração conhecida ( $\lambda$  *Hind*III). As amostras que estavam fora do padrão foram diluídas até atingirem a concentração ideal. Esta etapa foi considerada crucial para o desenvolvimento do trabalho, pois a técnica de AFLP necessita de DNA de

qualidade e em concentração uniforme.

### **3.5 - Reações de AFLP**

A técnica de AFLP é composta pelas etapas de digestão do DNA com enzimas de restrição (*EcoR I* e *Mse I*), ligação de adaptadores específicos aos terminais dos fragmentos de DNA gerados pela clivagem, pré-amplificação dos fragmentos de restrição utilizando os *primers* (*EcoR I +A* e *Mse I +C*), amplificação seletiva de fragmentos utilizando três bases seletivas e eletroforese dos fragmentos de DNA amplificados em gel de poliacrilamida.

Para execução dessa técnica utilizou-se o *AFLP Starter Primer Kit* (Invitrogen®). Nos próximos parágrafos, estão detalhados os passos que compõem cada uma dessas etapas.

#### **3.5.1 - Reação de digestão do DNA**

Em um tubo de microcentrifuga foram adicionados os seguintes componentes: 3 $\mu$ L de tampão de reação 5x [Tris-HCl 50mM (pH 7,5), acetato de magnésio 250mM, acetato de potássio 50mM], 3 $\mu$ L de DNA (150ng), 1,2 $\mu$ L *EcoR I/Mse I* [1,25u/ $\mu$ L em Tris-HCl 10mM (pH 7,5), NaCl 50mM, EDTA 0,1mM, DTT 1mM, 0,1mg/ $\mu$ L BSA, glicerol 50% (v/v), 0,1% Triton® x-100], 7,8 $\mu$ L de água destilada. Essa mistura foi homogeneizada e o conteúdo coletado através de centrifugação breve. Em seguida incubou-se a amostra (37°C por 2h) e depois, incubou-se novamente (70°C por 15 minutos) para inativar a restrição por endonucleases. O último passo foi colocar o tubo no gelo e coletar o conteúdo por centrifugação breve.

#### **3.5.2 - Ligação de adaptadores**

Ao DNA digerido proveniente da etapa anterior, adicionou-se 14,4 $\mu$ L de solução de ligação de adaptadores [adaptadores *EcoR I/Mse I*, ATP (0,4mM), Tris-HCl 10mM (pH 7,5), acetato de magnésio 10mM, acetato de potássio 50mM] e 0,6 $\mu$ L de T4 DNA Ligase [1u/ $\mu$ L em Tris-HCl 10mM (pH 7,5), DTT

1mM, KCl 50mM, glicerol 50% (v/v)]. Homogeneizou-se a mistura, coletou-se o conteúdo da reação através de centrifugação breve e incubou-se amostra (20 °C por 2h). Em seguida, realizou-se uma diluição da solução de ligação de 1:10 colocando 10µL da reação de ligação e acrescentando 90µL de tampão TE [Tris-HCl 10mM (pH 8,0), EDTA 0,1mM ].

### **3.5.3 - Pré-amplificação**

Em um microtubo de 0,2mL, foram adicionados 3µL do DNA diluído da etapa anterior, 20µL do *primer mix* pré-amplificação, 2,5µL de tampão da PCR 10x+Mg [Tris-HCl 200mM (pH 8,4), MgCl<sub>2</sub> 15mM, KCl 500mM] e 0,5µL da enzima *Taq* DNA Polimerase (5u/µL). Em seguida, a amostra foi levada ao termociclador utilizando-se a seguinte programação: 20 ciclos de (94 °C por 30s; 56 °C por 60s e 72 °C por 60s). Após a PCR, Realizou-se uma diluição dessa amostra pré-amplificada transferindo-se 3µL da amostra e adicionando-se 147µL de tampão TE [Tris-HCl 10mM (pH 8,0), EDTA 0,1mM].

### **3.5.4 - Seleção das combinações de *primers***

Para escolha dos *primers* utilizados no mapeamento, efetuou-se o teste de cada par de cada uma das 64 combinações de *primers* (Tabela 2), com o DNA dos genitores (macho e fêmea). Foram selecionadas as combinações que apresentaram maior número de bandas polimórficas.

A seleção de marcadores foi baseada no polimorfismo entre os genitores o marcador que estava presente em apenas um dos genitores foi selecionado como um marcador polimórfico e utilizado no mapeamento.

Tabela 2 – Combinações de *primers* testados nas reações de amplificação seletiva na população de 146 indivíduos, aonde M é *primer* complementar ao sítio de restrição da enzima *Mse I* e E é *primer* complementar ao sítio de restrição da enzima *EcoR I*.

	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CAT	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAC	√	√	√	√	√	√	√	√
E-AAG	√	√	√	√	√	√	√	√
E-ACA	√	√	√	√	√	√	√	√
E-ACC	√	√	√	√	√	√	√	√
E-ACG	√	√	√	√	√	√	√	√
E-ACT	√	√	√	√	√	√	√	√
E-AGC	√	√	√	√	√	√	√	√
E-AGG	√	√	√	√	√	√	√	√

### 3.5.5 - Amplificação seletiva

Para cada par de *primer* escolhido foram preparadas as seguintes soluções:

**Mix 1:** (50µL *primer EcoR I*) + (450µL *primer Msel*) = 500µL (suficiente para 100 reações);

**Mix 2:** (790µL de água destilada) + (200µL de tampão de PCR (10x + Mg)) + (10µL de *Taq DNA Polimerase* (5u/µL)) = 1000µL (suficiente para 100 reações);

**Mix 3:** (250µL de DNA diluído) + (250µL de Mix 1) + (500µL de Mix 2) = 1000µL (suficiente para 100 reações).

Após o preparo das reações realizou-se uma PCR em um termociclador PTC 100 da MJ Research programado conforme a Tabela 3:

Tabela 3 – Programação utilizada na reação de amplificação seletiva no termociclador. Aonde: (°C) é a temperatura em graus celsius; (Tempo) é dado em segundos e refere-se a cada ciclo.

Programa	°C	Tempo(s)	°C	Tempo(s)	°C	Tempo(s)	Nºciclos
1	94	60	65	60	72	90	1
2	94	60	64	60	72	90	1
3	94	60	63	60	72	90	1
4	94	60	62	60	72	90	1
5	94	60	61	60	72	90	1
6	94	60	60	60	72	90	1
7	94	60	59	60	72	90	1
8	94	60	58	60	72	90	1
9	94	60	57	60	72	90	1
10	94	60	56	60	72	90	1
11	94	30	56	30	72	60	23

Para visualização dos fragmentos de DNA realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida, corado com Nitrato de Prata.

### 3.5.6 – Preparo dos géis e condições de eletroforese

Os géis foram preparados, utilizando-se duas placas de vidro de tamanhos diferentes. Entre as placas colocou-se espaçadores com 2 mm de espessura e as extremidades vedadas com fita adesiva, deixando-se apenas a parte superior aberta. A placa maior foi tratada com *Bind Silane* que serve para aderir o gel e evitar que esse se desprenda durante a manipulação. A placa menor foi tratada com *Repel Silane*, para que esta se desprenda uniformemente do gel.

A solução do gel foi preparada utilizando-se os seguintes componentes:

- 22,5g de uréia;

- 10mL de TBE 5X (54g Tris-Base, 27,5g Ac. Bórico, 20mL EDTA 0,5M (pH 8,0), completou-se com água deionizada até 1 L e ajustou-se o pH do tampão até próximo a 8,3);
- 7,5mL de Acrilamida:Bisacrilamida 19:1 (38g de Acrilamida, 2g de Bisacrilamida completou-se até 100mL);
- Água deionizada quantidade suficiente para 50mL.

Os componentes foram dissolvidos em agitador magnético até a diluição total da uréia. Depois de a solução esfriar, acrescentou-se 360µL de APS (Persulfato de Amônio 10%) e 72µL de TEMED, e imediatamente verteu-se a solução entre as placas, em um ângulo de aproximadamente 45 graus. Após o completo preenchimento, introduziram-se os pentes com a parte lisa na solução para delimitar o espaço aonde, posteriormente se aplicaria as amostras.

Após a polimerização do gel, realizou-se uma pré-corrida em cuba de eletroforese vertical (Life – model S2001), ligada a uma fonte (Amershan) com voltagem constante de 60W (Watts) por aproximadamente 30 minutos. Após a pré-corrida procedeu-se a lavagem da região superior do gel injetando tampão com uma seringa. Após a completa lavagem, os pentes foram introduzidos até os dentes entrarem em contato com o gel. Antes da aplicação das amostras no gel, realizou-se uma desnaturação das amostras por 5 minutos a 94°C, utilizando igual volume de tampão de desnaturação (*loading buffer*). Após a desnaturação, as amostras foram imediatamente resfriadas a 4°C e aplicadas no gel. Após 2 horas de corrida retirou-se a placa da cuba de eletroforese e iniciou-se o processo de revelação.

Antes de retirar a placa menor, esta foi resfriada com gelo, para facilitar o desprendimento do gel. A placa maior na qual o gel estava aderido era imediatamente colocada em solução fixadora I (100mL de Etanol (PA) + 10mL de Ácido Acético (PA) + água destilada até volume de dois litros), durante 20 minutos sob agitação orbital leve. Eliminou-se a solução fixadora I e realizou-se 2 lavagens de 5 minutos com água destilada. Descartou-se a água de lavagem e em seguida foi acrescentada a solução fixadora II (30mL de Ácido Nítrico + água destilada até volume de dois litros) deixando sob agitação orbital leve durante 3 minutos. A solução fixadora II foi eliminada procedendo-se em

seguida, 2 lavagens de 5 minutos com água destilada. Acrescentou-se a solução de Nitrato de Prata (4 g nitrato de prata dissolvido em dois litros de água destilada), deixando sob agitação orbital leve durante 30 minutos.

Eliminou-se essa solução e procedeu-se uma lavagem rápida de 30 segundos com água destilada. Após eliminar a água de lavagem, a solução reveladora (60g de Carbonato de Sódio dissolvidos em 500mL de água destilada + água destilada gelada até completar 2 litros + 1mL de Formaldeído) é acrescentada em duas partes. Primeiramente 500 mL da solução reveladora gelada 4°C até adquirir uma coloração preta. Eliminou-se os 500 mL e adicionou-se o restante da solução reveladora gelada 4°C, deixando sob agitação orbital constante até o completo aparecimento das bandas. Retirou-se a solução reveladora e acrescentou-se a solução finalizadora (Acido Acético 10% e água suficiente para dois litros) deixando sob agitação orbital leve até que não houvesse mais bolhas. Eliminou-se a solução finalizadora e adicionou-se água destilada até a total cobertura do gel. Após a lavagem com a água, deixou-se o gel secar e finalmente foram identificadas as bandas polimórficas para o mapeamento entre os genótipos TP e CD202.

### **3.5.7 – Obtenção dos marcadores para confecção do mapa**

Todas as etapas que compreendem a escolha dos *primers* microssatélites e RAPD, preparo dos géis e avaliação das bandas polimórficas, foram efetuadas pela equipe de Biotecnologia da COODETEC. Esta equipe gerou uma matriz binária com dados dos marcadores microssatélites e RAPD para os 96 indivíduos avaliados. Estes dados juntamente com os dados dos marcadores AFLP foram usados para construção do mapa genético do tegumento da soja.

Os marcadores AFLP, foram visualizados e avaliados após a revelação dos géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata. Os indivíduos avaliados para os marcadores AFLP, foram os mesmos utilizados para a obtenção dos marcadores microssatélites e RAPD. Essa avaliação foi feita toda visualmente, com auxílio de transluminador e para cada marcador polimórfico presente atribuía-se valor 1 (Um) e para marcadores ausentes, atribuía-se valor

0 (Zero).

### **3.5.8 – Análise dos marcadores para confecção do mapa**

Para verificar se os marcadores obtidos estavam segregando na proporção mendeliana esperada de 1:1:2 (microssatélites) ou de 3:1 (AFLP e RAPD), foi utilizado o teste do  $\chi^2$  (Qui-quadrado) a uma probabilidade de erro de 5% no programa GQMOL 2.1 (CRUZ & SHUSTER, 2004).

O fator de correção de Bonferroni foi aplicado aos dados da segregação dos marcadores (CRUZ & SHUSTER, 2004). Para a construção dos mapas genéticos foi utilizado o programa Mapmaker 3.0 (LINCOLN et al., 1992).

Primeiramente foi construído um esqueleto dos grupos de ligação utilizando como parâmetro um LOD de 3.0 e uma distância máxima de 30 cM.

As distâncias no mapa foram determinadas com a utilização da função Kosambi (Kosambi, 1944). Nesta primeira etapa foi utilizado o comando “order”, que é baseado na análise de multipontos para estabelecer a melhor ordem dos marcadores dentro de cada um dos grupos de ligação.

Após o estabelecimento do esqueleto dos grupos de ligação, foram acrescidos mais marcadores com a utilização do comando “try”, sob um LOD de 3,0 e uma distância máxima de 35 cM.

Os caracteres fenotípicos, cor do tegumento e cor do hilo, foram adicionados junto com os marcadores de acordo com os comandos utilizados para os marcadores.

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Mapa genético com marcadores microssatélites, RAPD e AFLP

Foram testados 600 *primers* microssatélites e 50 RAPD nos dois genitores, ou seja, na linhagem TP e na cultivar CD202. Do total de 650 *primers* testados, 61 (10, 17%) *primers* microssatélites e 9 (4,5%) RAPD, foram usados como marcadores, pois apresentaram polimorfismos entre os genitores.

Na população somente foram amplificados marcadores microssatélites que estavam em grupos que, pelo mapa da soja, tinham mais de um marcador entre os polimórficos. Aqueles marcadores que eram sozinhos em um grupo não foram utilizados, pois não contribuiriam com o mapa. Restaram, então, 44 *primers* microssatélites e 9 RAPD. Deste total de 53 marcadores, 6 foram excluídos pelo teste de Qui-quadrado, utilizando-se do critério de proteção de Bonferroni para testes múltiplos, restando 47 marcadores para o mapeamento.

Dos 47 marcadores restantes, 23 não foram ligados. Embora estejam dentro dos grupos formados, a distância é muito grande para aparecerem ligados. Então, o mapa foi feito com apenas 24 marcadores, sendo estes 20 marcadores microssatélites e 4 RAPD.

Quanto aos marcadores AFLP, foram gerados a partir dos testes efetuados com as 64 combinações disponíveis no *AFLP Starter Primer Kit* (Invitrogen®). Foram escolhidas 4 combinações de *primers*, as quais, geraram 17 marcadores polimórficos. Destas 4 combinações, apenas 3 apresentaram marcadores que estavam segregando na proporção esperada.

Tabela 4 – Combinações de *primers* AFLP utilizados e número de marcadores polimórficos gerados, a partir da avaliação entre os genitores (TP e CD202).

Combinação	Primer E	Primer M	Nº Marcadores
9	AGG	CAC	4
17	ACC	CAG	1
21	AAC	CAG	6

Do total de 17 marcadores polimórficos, 11 foram utilizados, pois foram ligados a grupos de ligação. Os outros 6 marcadores, não foram utilizados no mapa devido ao fato de encontrarem-se muito distantes dentro dos grupos de ligação e por isso não contribuiriam para o mapa. Como estes marcadores AFLP, foram os primeiros a ser alocados no mapa genético do tegumento da soja, denominou-se estes como LSBA (Laboratório de Sementes e Biotecnologia AFLP), seguido pelo número do marcador.

O mapa gerado (Figura 1) cobriu uma distância de 439,3 cM, sendo que a proporção de marcadores ligados por grupo de ligação foi de 2 marcadores, sendo que apenas nos grupos de ligação GL3, GL9 e GL10 se ligaram 3, 5 e 5 marcadores, respectivamente. Os tamanhos dos grupos de ligação variou de 4,9 cM a 36,9 cM.

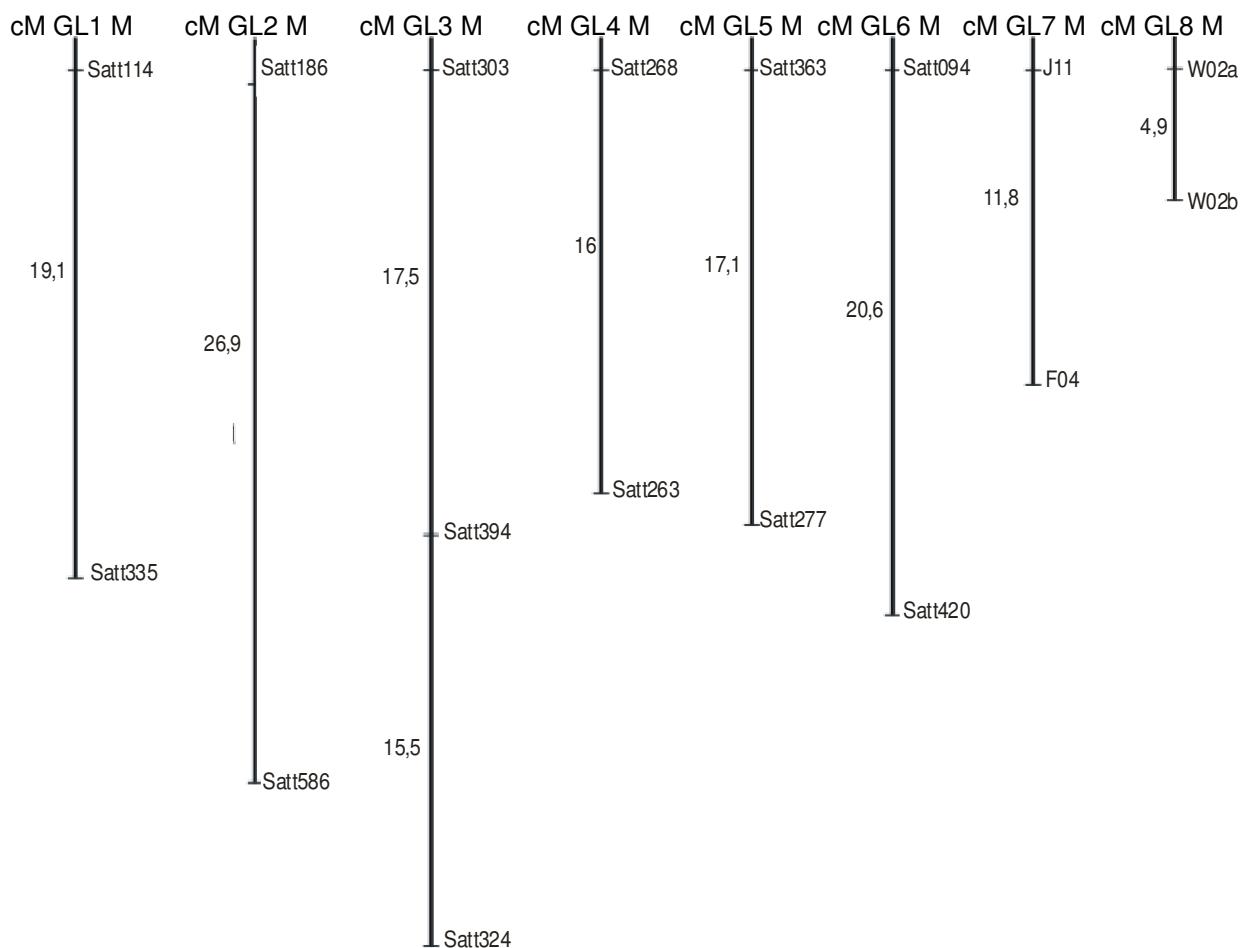
A distância média entre os marcadores mapeados foi de 21,97 cM. Cerca de 6 intervalos entre dois marcadores apresentaram distância superior a 30 cM, estando estes intervalos nos grupos de ligação GL9, GL10, GL11, GL12 e GL13.

O mapa genético obtido neste trabalho pode ser considerado como um mapa básico, uma vez que o número de marcadores mapeados não chegou a formar grupos de ligação em cada cromossomo da soja. Para a soja, o ideal seria o mapa apresentar 20 grupos de ligação, pois corresponderia ao número de cromossomos da espécie. Esta falta de grupos de ligações se deve ao fato de se terem utilizados poucos marcadores polimórficos na construção do mapa.

A ocorrência de baixo nível de polimorfismo entre os marcadores, se deve ao fato da soja apresentar uma base genética muito estreita, ou seja, mesmo cruzando germoplasmas distantes, estes apresentarão alto nível de

semelhança.

Quanto às características fenotípicas (cor do tegumento e cor do hilo), não foram ligadas a nenhum dos grupos de ligação, devido a falta de marcadores por grupos de ligação, bem como, a ausência de 7 grupos de ligação aonde estas características poderiam estar alocadas.



Continua...

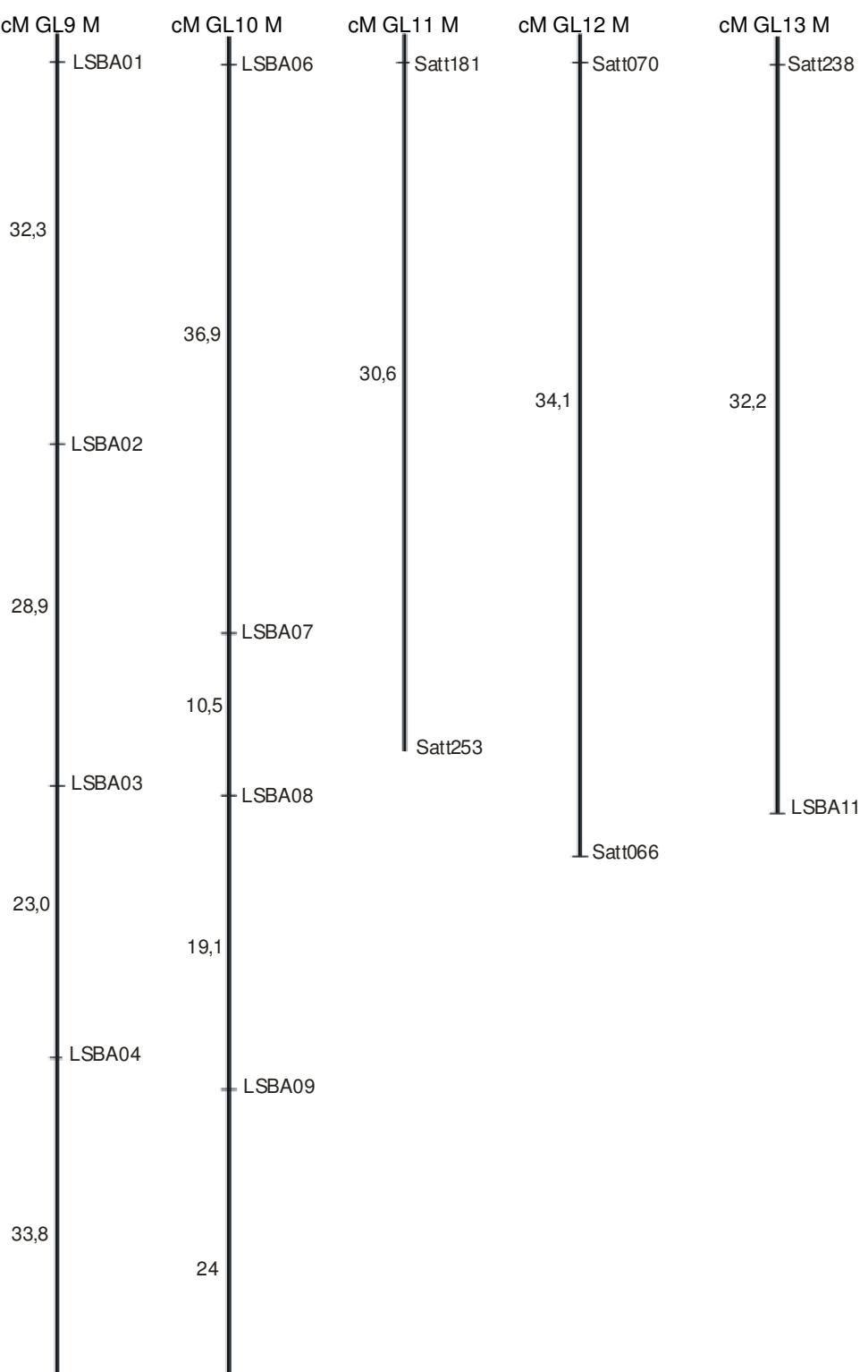


Figura 1 – Mapa genético do tegumento da soja, construído com base em marcadores microssatélites, RAPD e AFLP utilizando plantas F2 (microssatélites e RAPD) e famílias F3 (AFLP) oriunda do cruzamento entre os genótipos CD202 e TP. Aonde cM é a distância entre marcadores dada em centiMorgans; GL é o Grupo de ligação (Cromossomo + marcadores); M é a denominação dada ao marcador.

## **5 – CONCLUSÕES**

Os marcadores moleculares utilizados foram eficientes para a formação de 13 grupos de ligação no mapa genético do tegumento da soja.

Não foi possível posicionar os caracteres cor do tegumento e cor do hilo em nenhum grupo de ligação gerado.

## **CAPITULO II**

**Análise *in silico* dos marcadores microssatélites**

## 6 - INTRODUÇÃO

O início do projeto de seqüenciamento do genoma humano em 1990 e a subsequente disponibilização de equipamentos como seqüenciadores de DNA fez com que banco de dados e ferramentas de análise tivessem que se adaptar a um volume crescente de informações. O seqüenciamento de organismos modelo como *Arabidopsis thaliana* (*The Arabidopsis Genome Initiative*<sup>2</sup>, 2000) e *Drosophila melanogaster* (ADAMS et al., 2000), além de espécies de interesse agrícola como o arroz (IRGSP-*International Rice Genome Sequence Project*, *The map-based sequence of the rice genome*<sup>3</sup>) e a cana-de-açúcar (*Sugar Cane EST Genome Project*, (Vettore et al., 2001)) marcaram o início da era genômica. Com esses avanços, vários genes tiveram suas seqüências desvendadas, as quais passaram a ser depositadas em bancos de dados (*GenBank* NCBI - National Center for Biotechnology Information, EMBL - European Bioinformatics Institute, GRAMENE - *A Comparative Mapping Resource for Grains*, TIGR - *The Institute for Genomic Research*) em uma quantidade de milhares de pares de base (pb) (SANTOS et al., 2003). Aliado a essas tecnologias, o uso de marcadores moleculares também contribuiu para o aumento das informações e detalhamento do genoma dos eucariotos.

Segundo Maia (2007), um padrão de DNA repetitivo denominado Microssatélites (LITT e LUTY, 1989) ou ainda SSR (*Single sequence repeats*) (TAUTZ et al., 1989) são sequências de DNA constituídas por arranjos formados por 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 nucleotídeos que repetem lado a lado (em série)

---

<sup>2</sup> A autoria deste trabalho deverá ser “*The Arabidopsis Genome Initiative*”. Uma lista completa dos colaboradores aparece no final do artigo original (Nature, 408: 796-815).

<sup>3</sup> A autoria deste trabalho deverá ser “*The map-based sequence of the rice genome*”. Uma lista completa dos colaboradores aparece no final do artigo original (Nature, 436: 793-800).

(JACOB et al., 1991), encontrados em alta freqüência nos genomas de eucariotos (TÓTH et al. 2000) e mais propensas à ocorrência de laço (*loops*) ou estruturas conhecidas como *hairpins*, pois, durante a ação de replicação a *DNA polimerase* pode sofrer um “escorregão” provocando inserção ou deleção de pares de bases, promovendo, dessa forma, um aumento ou redução no tamanho da seqüência de repetição. Para Varshney et al. (2005a), esta classe de ocorrências (mutações) é poderosa em variadas aplicações como marcadores moleculares, devido a sua reproducibilidade, natureza multi-alélica, característica co-dominante e abundância em genomas.

Morgante e Olivieri, (1993) citam que a técnica de marcadores moleculares microssatélites tem por base o uso de pares de iniciadores (*primers*), na reação de PCR, para flanquear os *locos* contendo as seqüências repetidas e mostrar através da análise de produtos de PCR (*amplicons*) se ocorreram deleções ou inserções dos motivos da repetição.

O uso da técnica de microssatélite tem aumentado nos últimos anos, principalmente devido à construção de mapas genéticos (servem como base) e aos avanços obtidos no seqüenciamento automático, o que permitiu identificar as seqüências que flanqueiam os sítios repetitivos, para o desenho de *primers* complementares (MALONE & ZIMMER, 2005).

No passado, a grande limitação para o uso da técnica dos microssatélites em larga escala era a obtenção dos *primers* usados na PCR, sendo uma estratégia trabalhosa e demorada (MAIA, 2007), pois, em geral somente 10 a 20% dos *primers* desenvolvidos pelas tecnologias tradicionais são informativos ou eficientes no estudo da similaridade genética de uma população, contribuindo, desta forma, para a elevação dos custos e envolvimento de pessoal especializado (BUSO et al., 2003).

Atualmente um grande numero de informações obtidas em projetos de bibliotecas de ESTs (*Etiquetas de Seqüências Expressas*), estão sendo depositadas no GenBank. A busca de seqüências ESTs contendo *locos* microssatélites nesses bancos de dados é uma estratégia que minimiza as dificuldades encontradas anteriormente na obtenção desses marcadores. Além disso, um segundo fator bastante relevante a ser considerado é que os marcadores obtidos a partir desses bancos de dados têm um alto valor

informativo, pois, necessariamente, são derivados de regiões funcionais dos genomas, a partir de seqüenciamento de RNAs expressos (DNA), denominados marcadores funcionais.

*Primers* informativos são aqueles que permitem a geração de marcadores moleculares associados a regiões funcionais do genoma, os quais têm sido descritos como marcadores funcionais (FM – *functional markers*). Em contraste, existem marcadores aleatórios associados a regiões que não codificam para nenhum gene os quais foram denominados (RM – *random markers*) (VARSHNEY, 2005b).

Com a atual evolução da bioinformática, alguns protocolos *in silico* possibilitam a busca nos bancos de ESTs por regiões de ancoramento dos *primers* microssatélites, permitindo, desta forma, predizer se estes amplificam genes alvos, produtos próximos de genes de interesse ou regiões genômicas não funcionais. Considerando o elevado volume de informações disponíveis e a possibilidade de análise *in silico*, a seleção dos *primers* previamente aos trabalhos de mapeamento genético reduziria o trabalho e permitiria a utilização de marcadores mais informativos no mapa genético.

Esta segunda parte do trabalho teve por objetivo localizar *in silico* seqüências amplificadas pelos *primers* microssatélites utilizados na construção do mapa genético do tegumento da soja e através da busca por homologias, predizer a função gênica das regiões acessadas.

## 7 - MATERIAL E MÉTODOS

### 7.1 – Busca das seqüências dos marcadores

As seqüências analisadas neste trabalho foram as dos *primers forward* e *reverse* dos marcadores microssatélites do mapa genético do tegumento da soja gerado a partir da matriz binária fornecida pela equipe de biotecnologia da COODETEC. Estas seqüências dos *primers* microssatélites (Tabela 1), estão disponíveis *on line*, sendo que para este trabalho o banco de dados acessado foi o <http://soybase.agron.iastate.edu>, e a opção utilizada foi, *Resources SSR*.

Tabela 1 - Seqüências dos *primers* utilizados como marcadores no mapa genético do tegumento da soja

<b>Marcador</b>	<b>Primer Forward</b>	<b>Primer Reverse</b>
Satt335	CAA GCT CAA GCC TCA CAC AT	TGA CCA GAG TCC AAA GTT CAT C
Satt094	CCA AGT GCC AAT GAA G	ATC CAT GGT TTT TTG ATG
Satt420	GCG TAT TCA GCA AAA AAA TAT CAA	TTA TCG CAC GTG TAA GGA GAC AAA T
Satt186	GGG AAG TTA TAA GCA GAT GGG GGA ACC ACA AAA ATC TTA	GGG AAT CCA TTC CTG ATG AGT
Satt311	ATC	GTT GAA GCT CAG GCT GTG ATG AAT
Satt181	TGG CTA GCA GAT TGA CA	GGA GCA TAG CTG TTA GGA
Satt253	GCG CCC TAA TAA AGATAAGAC AAG TAA AAA TTA AAA TAC TAG AAG ACA	GCG TGG CCT TTT CCC ATT TA
Satt070	AC GGG AAG CTT AAT AAT GAA AAT	TGG CAT TAG AAA ATG ATA TG
Satt066	GAC AC	TTG ATC ACT TCT GTA ACA TTC
Satt233	AAG CAT ACT CGT CGT AAC CAA CCT GTA TTC CAC AAA AAA TCT	GCG GTG CAA AGA TAT TAG AAA GCG CCC CAA TTT GAC TAT AAA TAA AAG
Satt424	CAC C	T
Satt079	AGT CGA AGA TAC ACA ATT AGA T	CTT TTA GAC ACA AAT TTA TCA CT
Satt307	GCG CTG GCC TTT AGA AC	GCG TTG TAG GAA ATT TGA GTA GTA AG

## 7.2 – Alinhamento das seqüências

O alinhamento das seqüências dos *primers* de microssatélites com as do banco de ESTs da soja, foi realizada utilizando-se os programas *SSR locator* e o *BLAST Basic Local Alignment Search Tools* (ALTSCHUL et al., 1990, 1997).

Após o alinhamento, partiu-se para a busca no *GenBank/NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), da identificação (*ID - identification*) da seqüência depositada no banco de ESTs.

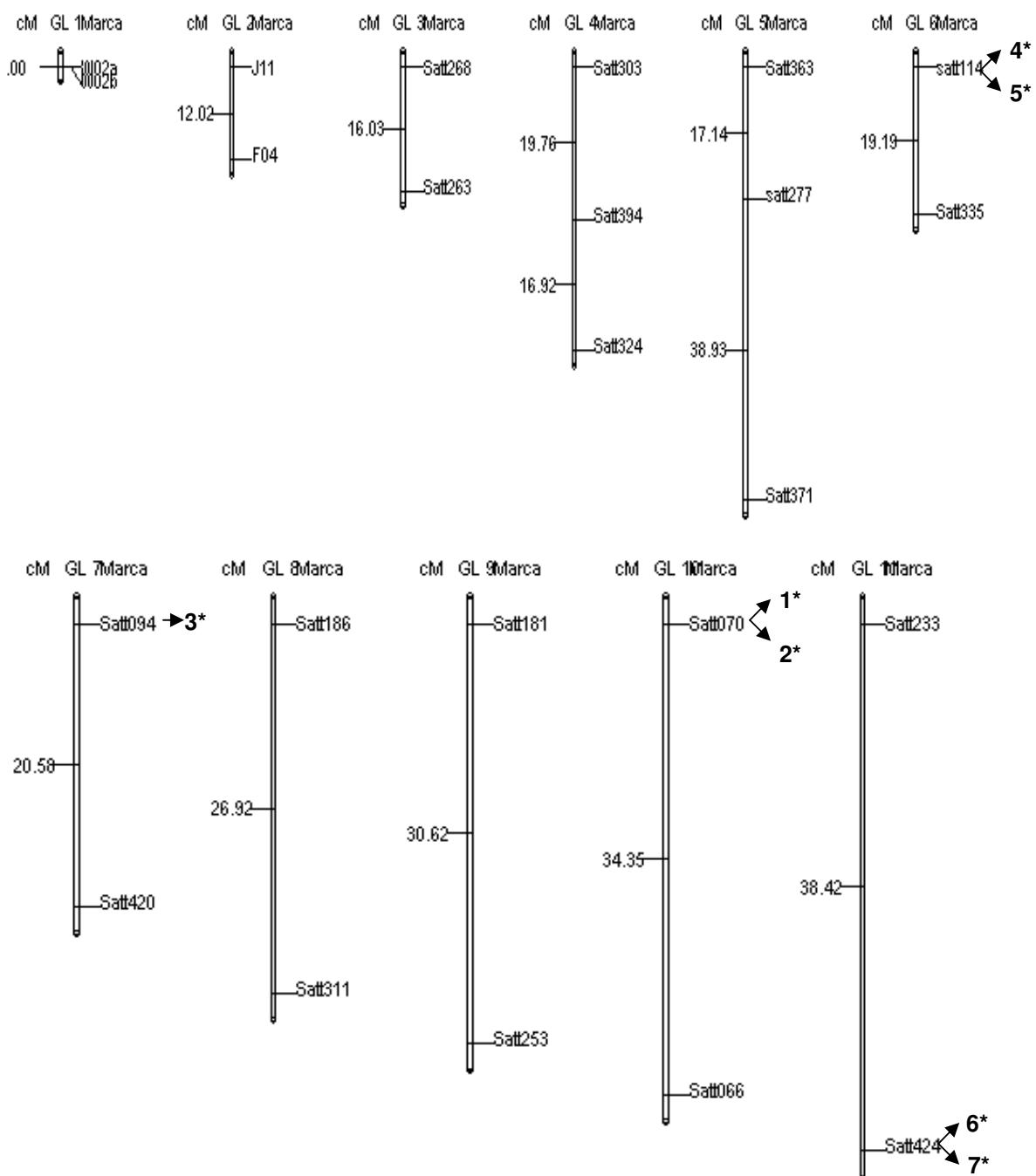
De posse da *ID*, no próprio site do *NCBI*, foram encontradas as seqüências de nucleotídeos (FASTA). Com esta seqüência, fez-se a busca no banco de dados públicos TIGR (<http://www.tigr.org/tdb>) para procurar seqüências de DNA e de proteínas, o que é uma metodologia eficiente para a obtenção de informações sobre estrutura e função dos genes e moléculas envolvidas.

Estas informações geradas, através das ferramentas de bioinformática, propiciaram a realização de um estudo dos genes e proteínas que flanqueiam os microssatélites estudados, quanto à função biológica e relação com a qualidade/tegumento de sementes de soja.

## 8 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo da análise de ESTs é gerar, rapidamente, dados sobre os genes que codificam proteínas de um determinado tipo de célula, organismo ou parte do mesmo. Através do software SSR *locator*®, não se alinhou nenhum EST com as seqüências de *primers forward* e *reverse*, pelo fato deste alinhar apenas seqüências exatas, ou seja, com 100% de homologia.

Através do programa BLAST, alinharam-se seqüências dos ESTs com a dos marcadores utilizados para a construção do mapa genético da soja, devido ao fato de que neste programa pode-se optar por alinhamento de seqüências com menor grau de homologia. Dos 20 marcadores microssatélites usados para a construção do mapa genético do tegumento da soja, apenas quatro apresentaram homologia com seqüências depositadas em bancos de dados de ESTs (Figura 1).



1\* - *F-box family protein*;  
 2\* - *Protein kinase*;  
 3\* - *Phytoene synthase*;  
 4\* - *Vacuolar ATPase*

5\* - *Peptidase S41*  
 6\* - *Isoflavone reductase*  
 7\* - *Pinoresinol-lariciresinol reductase*

Figura 1 – Marcadores microssatélites do mapa genético do tegumento da soja, utilizados para a busca no banco de ESTs. Aonde cM é a distância entre marcadores dada em centiMorgans; GL é o Grupo de ligação (Cromossomo + marcadores); Marca é a denominação dada ao marcador.

Os marcadores microssatélites que contém seqüências homologas de DNA e/ou proteínas, estão descritos abaixo (Tabela 2).

Tabela 2 – Marcadores microssatélites que apresentaram homologia com seqüências de DNA e/ou Proteínas depositadas no banco de dados TIGR.

Marcador	DNA/Proteínas similares
<i>Satt070</i>	<i>F-box family protein</i>
<i>Satt070</i>	<i>Protein kinase</i>
<i>Satt094</i>	<i>Phytoene synthase</i>
<i>Satt114</i>	<i>Vacuolar ATPase</i>
<i>Satt114</i>	<i>Peptidase S41</i>
<i>Satt424</i>	<i>Isoflavone reductase</i>
<i>Satt424</i>	<i>Pinoresinol-lariciresinol reductase</i>

O marcador *Satt070* apresentou homologia com o complexo *F-box protein family*, que segundo Kipreos & Pagano (2000), é constituído de aproximadamente 50 aminoácidos, que funcionam como sítios aonde ocorrem interações entre proteínas, como por exemplo, regulação do crescimento do citoesqueleto. O citoesqueleto das células vegetais é formado pelos microtubulos e filamentos de actina, sendo que estes estão ligados ao crescimento e deposição da parede celular (RAVEN et al., 1996). O marcador *satt070*, poderá tornar-se promissor em estudos na área de sementes, pois poderá ajudar a alterar a expressão deste tipo de proteína em variedades de soja que apresentam maior fragilidade da parede celular e consequentemente, maior dano fisiológico da semente em decorrência das características do tegumento.

Ainda para o marcador *Satt070*, observou-se que este apresenta homologia com a enzima *Protein Kinase*. Segundo Buchanan et al. (2000) esta enzima é responsável pela hidrólise de lipídios e também atua no sistema de defesa contra ataque de patógenos, aonde é ativada pelo cálcio e leva a liberação de  $O_2$  e  $H_2O_2$ , os quais agem na morte do patógeno, assim como, na

formação de ligações cruzadas oxidativas na parede celular e na peroxidação de lipídios na membrana plasmática, o que leva a expressão de genes de resistência do hospedeiro (MEHDY, 1994). Segundo estudos conduzidos por Peske & Pereira, (1983), uma das principais funções do tegumento da soja é servir como barreira para a entrada de patógenos e/ou microorganismos. Portanto, o incremento da resistência à infecção por patógenos em cultivares de soja, irá diminuir as perdas causadas na qualidade fisiológica das sementes de soja.

O marcador *Satt094*, por homologia, apresenta-se relacionado à enzima *Phytoene synthase*, a qual está relacionada diretamente com a produção de carotenóides em sementes, ou seja, pigmentos que dão coloração as sementes (LICHTENTHALER et al., 1997). Em sementes de tomate esta enzima levou a formação de maior quantidade de licopeno, luteína, xantofilas e  $\beta$ -caroteno, sendo que em sementes de canola aumentou em 50% a produção de carotenóides (FRASER et al., 2002). Esta enzima também atua nos mecanismos de dormência das sementes, segundo estudos de Estévez et al. (2001), maiores taxas de *Phytoene* em tecidos embrionários limitam a síntese de ABA (ácido abcíssico), sendo que altas taxas de ABA levam a germinação desuniforme das sementes (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN et al., 2001).

Para o marcador *satt114* foi observada homologia com duas enzimas, a *Vacuolar ATPase* e a *Peptidase S41*. A *Vacuolar ATPase* está associada com a liberação de substâncias que irão facilitar na protusão da radícula, isto após receber estímulos por giberelina (BRADFORD & TREWAVAS, 1994). Em variedades com tegumentos mais resistentes, torna-se de grande importância o estudo do mecanismo de ação desta enzima e de outros genes envolvidos nos mecanismos de germinação.

Quanto a *Peptidase S41* ela degrada as proteínas de reserva para suprir a necessidade de novos aminoácidos durante o processo de germinação (BUCHANAN et al., 2000). Muitas pesquisas foram conduzidas sobre as peptidases, mas especificamente na área de sementes, tem-se muito a descobrir, pois conhecendo esse mecanismo, novas variedades poderão ser desenvolvidas, sendo estas capazes de maximizar a utilização de reservas

para a germinação e emergência, e assim garantir um melhor desenvolvimento inicial das plantas.

A enzima *Isoflavone reductase*, apresenta homologia ao marcador Satt424. Isoflavonóides são produtos naturais biologicamente ativos que acumulam em sementes de soja durante o desenvolvimento (WINKEL-SHIRLEY, 2001). A quantia de isoflavonóides presentes em sementes de soja é variável, dependendo de fatores genéticos e ambientais que não são entendidos completamente (STEELE et al., 2001). Para Buchanan et al. (2000), esta enzima encontra-se na rota metabólica que leva a síntese de flavonóides ou de lignina. Estudos realizados por Todd & Vodkin (1993), demonstram que sementes de soja com tegumento preto apresentam acúmulo de flavonóides nas paredes da epiderme. Algumas classes de flavonóides, como as antocianinas, são responsáveis pela coloração dos tegumentos das sementes. Segundo Asiedu & Powell (1998), a cor do tegumento das sementes é uma característica associada com a permeabilidade à água, enquanto a pigmentação do tegumento das sementes está correlacionada com a baixa taxa de absorção de água das sementes em algumas espécies de Fabaceas. A permeabilidade das sementes, assim como a susceptibilidade a danos mecânicos está associada ao teor de lignina, o que é de extrema importância para a preservação da qualidade fisiológica das sementes, podendo estas, apresentarem maior longevidade e menor deterioração no campo (SOUZA & MARCOS FILHO, 2001). Pelo grande número de alternativas que podem levar a produção de sementes de soja com qualidade fisiológica distintas, considera-se de suma importância a realização de estudos mais aprofundados sobre a rota metabólica dos isoflavonóides.

A enzima *Pinoresinol-lariciresinol reductase*, homóloga ao marcador Satt424, está envolvida na biossíntese da lignina. Lignina é um polímero natural que ocorre no tegumento das sementes de soja e a presença de altos conteúdos desse composto, propicia melhor qualidade de sementes devido a uma maior resistência ao dano mecânico e à deterioração por umidade. Isto pode ser comprovado quando se compara sementes escuras com sementes de tegumento amarelo, aquelas apresentam qualidade superior devido ao seu maior conteúdo de lignina (FRANÇA NETO et al., 2000). Devido ao exposto,

estudos envolvendo esta enzima, a fim de se obter o melhor conhecimento bioquímico, fisiológico e molecular são muito importantes para posteriores aplicações diretas em áreas como a de sementes.

## 9 – CONCLUSÕES

Os marcadores microssatélites (*satt070*, *satt094*, *satt114*, *satt424*) estão ancorados em seqüências disponíveis no banco de ESTs da soja, muito importantes para a qualidade fisiológica das sementes de soja.

A aplicação da bioinformática é de grande utilidade para estudos que avaliam parâmetros como o estudado, pois muitas das seqüências homologas com os marcadores não levaram diretamente a rotas como a da lignina, mas demonstraram outros mecanismos que também estão relacionados com a qualidade fisiológica das sementes.

A associação da bioinformática com outras áreas da agronomia, é muito promissora, pois além de aumentar o entendimento dos resultados obtidos em pesquisas, pode atuar como direcionadora de programas de melhoramento.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram avaliados 600 *primers* microssatélites, nove *primers* RAPD e 64 combinações de *primers* AFLP, os quais possibilitaram a elaboração de mapa genético para o tegumento da semente de soja. O mapa possui 33 marcadores moleculares distribuídos nos 13 grupos de ligação, no entanto não permitiu a associação de nenhum caráter de interesse.

Logo, estudos preliminares podem ser realizados para gerar um mapa genético mais informativo, com menores investimentos e menos tempo.

As ferramentas *in silico* testadas, mostraram ser altamente promissoras, sendo necessário que os bancos de ESTs continuem sendo enriquecidos, tornando assim mais fácil construir *primers* informativos.

## 10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. D.; CELNIKER, S. E.; HOLT, R. A.; EVANS, C. A.; GOCAYN D. et al. **Science**. Washington, v.287, p.2185-2195, 2000.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W. et al. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**. London, v.98, p.12473-12478, 1990.

BARBOSA NETO, J.F. Seleção assistida por marcadores moleculares. In: MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, p.75-80, 1998.

BEARZOTTI, E. Mapeamento de QTL. In: Pinheiro, J.B. **Análise de QTL no melhoramento de plantas**: segunda jornada em Genética e melhoramento de plantas. Goiânia: FUNAPE, p.63-209, 2000.

BECKMANN, J. S.; SOLLER, M. Restriction Fragment length polymorphisms in plant genetic improvement. In: MIFLIN BJ, (Ed) **Oxford surveys of plant molecular & cell biology**. Oxford: Oxford University Press, v.3, p.196-250, 1986.

BORÉM, A. Aplicação dos marcadores moleculares no melhoramento de plantas. In: **Marcadores Moleculares**, Viçosa, p.79-84, 2006.

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

BRACCINI, A. L.; REIS, M. V.; SEDIYAMA, C. S.; ROCHA, V. S.; SEDIY T. Influência do processo de hidratação-desidratação na qualidade fisiológica de sementes de soja durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.19, nº1, p.80-87, 1997.

BRADFORD, K. J.; TREWAVAS, A. J. Sensitivity thresholds and variable time scales in plant hormone action. **Plant Physiology** 105: p.1029–1036, 1994.

BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P S.; BRONDANI, R. V. Marcadores Microssatélites em Espécies Vegetais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.7, p.46-50, 2003.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipo de marcadores moleculares. In: **Marcadores Moleculares**, Viçosa, p.9-78, 2006.

CAMARGO, L.E.A. Marcadores moleculares no melhoramento para resistência a doenças. In: NASS, LL; Valois, AFC; Melo, IS; Valadares-Inglis, MC. (eds.) **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, p.995-1010, 2001.

CARVALHO, N. M. & NACAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3º edição. Campinas, S.P.: Fundação Cargill, 424p., 1988.

CHANG, S.J.C.; DOUBLER, T.W.; KILO, V.; SUTTNER, R.; SCHMIDT, M.E.; GIBSON, P.T.; LIGHTFOOT, D.A. Association of loci underlying field resistance to soybean sudden death syndrome (SDS). **Crop Science**, v.36, p.1684-1688, 1996.

CHANG, S.J.C.; DOUBLER, T.W.; KILO, V.; ABU-THREDEIH, J.; PRAHBU R.; FREIRE, V.; SUTTNER, R.; KLEIN, J.; SCHMIDT, M.E.; GIBSON, P.T.; LIGHTFOOT, D.A. Association of loci underlying field resistance to soybean sudden death syndrome (SDS) and cyst nematode (SCN) race 3. **Crop Science**, v.37, p.965-971, 1997.

CONCIBIDO, V.; BOUTIN, S.; DENNY, R.; HAUTEA, R.; ORF, J.; YOUNG, N. D. Genome mapping of soybean cyst nematode resistance gene in peking, PI 91763, and PI 88788 using DNA markers. **Crop Science**, v.37, p.258-264, 1997.

CORNELIOUS, B.K.; SNELLER, C.H. Yield and molecular diversity of soybean lines derived from crosses of Northern and Southern elite parents. **Crop Science**, v.42, p.642-647, 2002.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: genética quantitativa e molecular. Laboratório de Bioinformática. Universidade Federal de Viçosa. Available at:<http://www.ufv.br/dbg/home3.html> Acessed on Dec. 1, 2004.

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

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores em Análise Genética**. 2ºed., Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1996.

FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A. & KRZYZANOWSKI, F. C. Seed production and technology for the tropics. In: EMBRAPA-CNPSO. **Tropical soybean**: improvement and production. Rome: FAO, p.217-240, 1994.

FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C. & COSTA, N. P. Tecnologia de produção de sementes. In: **A cultura da soja no Brasil**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 2000 – CD - Rom.

FRANÇA NETO, J.B.; POTTS, H.C. Efeitos da colheita mecânica e da secagem artificial sobre a qualidade da semente dura em soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.01, n.2, p.64-77, 1979.

FRASER, P. D.; ROMER, S.; SHIPTON, C. A.; MILLS, P. B.; KIANO, J. W.; MISAWA, N. DRAKE, R. G.; SCHUCH, W.; BRAMLEY, P. M. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. **Proc National Academy Science. USA** 99: 1092-1097, 2002.

GELDERMANN, H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. **Theoretical and Applied Genetics**, v.46, p.319-330, 1975.

GRODZICKER T.; WILLIANS J.; SHARP P.; SAMBROOK J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology**, v.39, p.439-446, 1974.

GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, p.715-740, 1999.

JACOB, H.J.; LINDPAINTNER, K.; LINCOLN, S.E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R.K.; MAO, Y.P; GANTEN, D.; DZAU, V.J.; LANDER, E.S. Genetics mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**. v.67, n.1, p.213-224, 1991.

KEIM, P.; DIERS, B. W.; OLSON, T. C.; SHOEMAKER, R. C. RFLP mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits. **Genetics**. V.126, p.735-742, 1990.

KIPREOS, E. T.; PAGANO, M. The F-box protein family. **Genome Biology**. V.1(5), p.25-30, 2000.

KOSAMBI, D. D. (1944) The estimation of map distances from recombination values. **Annals of Eugenics** 12: 172-175.

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of Marker-Assisted Selection in the Improvement of Quantitative Traits. **Genetics**, v.124, p.743-756, 1990.

LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSOM, J.; BARLOW, A.; DALY, M. J.; LINCOLN, S. E.; NEWBURG, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v.1, p.174-181, 1987.

LANNES, S. D.; ZIMMER, P. D.; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, F. I. F.; VIEIRA, E. A.; JUNIOR, A. M. M.; KOPP, M. M.; FREITAS, F. A. Regeneração in vitro de anteras de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) e mapeamento de QTL associado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, p.1355-1362, 2004.

LICHTENTHALER, H.K.; SCHWENDER, J.; DISCH, A.; ROHMER, M. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. **FEBS Lett** 400: 271–274, 1997.

LINCOLN, S.; DALY, M.; LANDER, E. **Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0**, White head Institute Technical Report, Cambridge, 97p. 1992.

LITT, M.; LUTTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed in vitro amplification of a dinucleotid repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p.398-401, 1989.

MA, E.; CHOLEWA, E.; MOHAMED, T.; PETERSON, C.A.; GIJZEN, M. Cracks in the Palisade Cuticle of Soybean Seed Coats Correlate with their Permeability to Water. **Annals of Botany Company**, 2004.

MALONE, G.; ZIMMER, P. D. Marcadores moleculares. In:**Ferramentas da biotecnologia no melhoramento genético vegetal**. Pelotas: UFPel, p.78-114, 2005.

MARTIN, A. C.; BARKLEY, W. D. Seed Identification Manual. **University of California Press**. p.172, 1973.

MEHDY, M. C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. **Plant Physiology** 105: 2, 467-472, 1994.

MEKSEM, K.; DOUBLER, T. W.; CHANCHAROENCHAI, K.; NJTTI, V.; CHANG, S. J. C.; RAO-ARELLI, A. P.; CREGAN, P.; GRAY, L. E.; GIBSON, P. T.; LIGHTFOOT, D. A. Clustering among loci underlying soybean resistance to fusarium solani, SDS and SCN in near-isogenic lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.1131-1142, 1999.

MERTZ, L. M. Caracterização morfo-fisiológica e identificação de fragmentos de cDNA diferencialmente expressos em tegumentos de sementes de soja com permeabilidade condratante. Pelotas, 2007, 60p., **Dissertação** (Mestrado), Universidade Federal de Pelotas.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998a

MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.5, p.14-17, 1998b.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. CONAB, 2005. Capturado em março de 2007. On-line. Disponível na Internet: <http://www.conab.gov.br/safras.asp>

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**. v.3, n.1, p.175-182, 1993.

PATERSON, A.H.; DAMON,; HEWITT, J.D.; ZAMIR, D.; RABINOWITCH, H. D.; LINCOLN, S. E.; LANDER, E. S.; TANKSLEY, S. D.; Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. **Genetics**, v.127, p.181-197, 1991.

PESKE, S. T. & PEREIRA, L. A.G. Tegumento da semente de soja. **Tecnologia de sementes**, v.6, p. 23-34, 1983.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

PROBST, A. H.; JUDD, R. W. Origem U.S. history and development and world distribution. In: CALDWELL, B.E. **Soybeans improvement, production and uses**. Madison: ASA: 1973. 618p. (ASA: Agronomy, 16).

REYNA, N.; SNELLER, C.H. Evaluation of Marker-Assisted Introgression of Yield QTL Alleles into Adapted Soybean. **Crop Science**, v.41, p.1317-1321, 2001.

ROCHA, R. B.; ALFENAS, P. F.; BARROS, W. S.; FERREIRA, F. M.; CRUZ, C. D.; ARAÚJO, E. F. Utilização do Método da Máxima Verossimilhança para comparação de populações utilizadas no mapeamento genético vegetal. **49º Congresso Brasileiro de Genética**, Águas de Lindóia, 2003.

RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; AHUMADA, I.; DIEZ-JUEZ, E.; SAURET-GÜETO, S.; LOIS, L. M.; GALLEGOS, F.; CARRETERO-PAULET, L.; CAMPOS, N.; BORONAT, A. 1-Deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. **Plant Journal**. 27: 213–222, 2001.

SANTOS, F. R.; ORTEGA, J. M. Bioinformática In: Melhoramento Genômico, Viçosa, p.165-185, 2003.

SILVA, A. R. Análise Genética de Caracteres Quantitativos em Milho com mo Delineamento III e Marcadores Moleculares. Piracicaba, 2002, 143p., **Tese** (Doutorado), Universidade de São Paulo.

SOLOMON, M.; BODNER, W.F. Evolution of sickle variant genes. **Lancet**, v.1, p.8122-8123, 1979.

SOUZA, F. H. D. & MARCOS-FILHO, J. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p. 365-375, 2001.

STAM, P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. **Plant Journal**, v.3, p.739-744, 1993.

STEELE, C. L.; GIJZEN, M.; QUTOB, D.; DIXON, R. A. Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. **Archives Biochemistry Biophysiology** 367: 146–150, 1999.

STUBER, C. W.; EDWARDS, M. D.; WENDEL, J. F. Molecular marker-facilities investigations of quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its components traits. **Crop Science**, v.27, p.639-648, 1987.

STUBER, C.W.; LINCOLIN, S.E.; HELENTJARIS, T.; LANDER, E.S. Identication of genetics factors contributing to heterosis in a hybrid from two maize imbred lines using molecular markers. **Genetics**, v.132, p.823-839, 1992.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acid Research**, v.17, n.16, p.6463-6471, 1989.

THÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes. **Genome Research**, v.10 n.7, p.967-981, 2000.

THOMPSON, J.A.; NELSON, R.L. Core set of primers to evaluate genetic diversity in soybean. **Crop science**, v.38, p.1356-1362, 1998.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genomics-assisted breeding for crop improvement. **Trends in Plant Science**, v.10, n.12, p.621-630, 2005a.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, v.23, n.1, p.48-55, 2005b.

VETTORE, A. L.; SILVA, F. R.; KEMPER, E. L.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p.1-7, 2001.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.4407-4414, 1995.

WEBB, D.M.; BALTAZAR, B.M.; RAO-ARELLI, A.P.; SCCHUPP, J.; CLAYTON, K.; KEIM, P.; BEAVIS, W.D. Genetic mapping of soybean cyst nematode race-3 resistance loci in the soybean PI 437654. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, p.574-581, 1995.

WEBER, J.L.; MAY, P.E. An abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p.388-396, 1989.

WELSH, J.; MCCELLLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Research**, v.18, p.7213-7218, 1990.

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

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. **Plant Physiology**, v. 126, p.485–493, June 2001.

YANG, X.; QUIROS, C. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. **Theory Applied Genetics**, v.86, p.205-212, 1993.

YUAN, J.; NJITI, V.N.; MEKSEM, K.; IQBAL, M.J.; TRIWITAYAKORN, K.; KASSEM, M.A.; DAVIS, G.T.; SCHMIDT, M.E.; LIGHTFOOT, D.A. Quantitative trait loci in two soybean recombinant inbred line populations segregating for yield and disease resistance. **Crop Science**, v.42, p.271-277, 2002.

ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application No 0534858, 1993.

