

MARCOS DE OLIVEIRA PINTO

**EXPRESSÃO E SUBSTITUIÇÃO ALÉLICA DOS
GENES DE DESSATURASES DE ÁCIDOS GRAXOS EM
SOJA**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Genética e Melhoramento,
para obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P659e
2012

Pinto, Marcos de Oliveira, 1983-
Expressão e substituição alélica dos genes de dessaturases
de ácidos graxos em soja / Marcos de Oliveira Pinto. –
Viçosa, MG, 2012.
xi, 80f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Glycine max*. 2. Genética vegetal. 3. Ácidos graxos
Ômega-3 - Síntese. 4. Ácidos graxos Ômega-6 - Síntese.
5. Plantas - Efeito da temperatura. 6. Regulação de expressão
gênica. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 633.342

MARCOS DE OLIVEIRA PINTO

**EXPRESSÃO E SUBSTITUIÇÃO ALÉLICA DOS
GENES DE DESSATURASES DE ÁCIDOS GRAXOS EM
SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

APROVADA: 24 de Agosto de 2012.

Prof. Humberto Josué de O. Ramos

(Co-orientador)



Prof. Pedro Ivo Vieira Good-God

Prof. Maurílio Alves Moreira

(Co-orientador)

Cynthia Maria Borges Damasceno

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros

(Orientador)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Pedro e Maria das Graças

Aos meus avôs paternos, Raimundo e Irani (*in memoriam*)

Aos meus avôs maternos, Antônio (*in memoriam*) e Josefa

A minha irmã, Dirlene

Aos meus familiares

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária – BIOAGRO – pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade oferecida para realização desse curso, ampliando os meus conhecimentos.

A todos os professores da UFV, especialmente aos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que contribuíram muito para a minha formação acadêmica e pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus familiares, principalmente meu pai e minha mãe, que me apoiaram durante essa longa caminhada.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros, por todo apoio e carinho durante os dez anos sob sua orientação.

Aos meus co-orientadores, Professores Maurílio Alves Moreira e Humberto Josué de Oliveira Ramos pela amizade, apoio e confiança.

Ao Professor Pedro Ivo Good-God, pela amizade, orientação e acompanhamento nos experimentos.

À Pesquisadora Cynthia Maria Borges Damasceno por aceitar participar da minha banca de Tese e pelas sugestões que foram muito valiosas para a versão final desse trabalho.

Ao Newton Deniz Piovesan, Maria Fernanda Antunes Cruz e Carla Quinhões, pela amizade e ajuda na condução dos experimentos.

Aos pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, pelo apoio, incentivo e compreensão durante o período de finalização da Tese.

Às estudantes de iniciação científica Ana Paula Mendes e Amanda Scottá Petrina, pela dedicação e contribuição para a realização desse trabalho.

Aos amigos dos laboratórios Proteína, Biomol, Sequenciamento e de Análises Bioquímicas por toda ajuda e agradável convivência.

Aos companheiros de curso de graduação e pós-graduação, e amigos da UFV, pelos ensinamentos, convívio e amizade.

Aos meus amigos das Repúblicas Casa das Prima, Fundu du Poço e do Alojamento 1421 – Alessandro, Sávio, André, Alan, Anderson, Hamilton, Guilherme, Márcio, Alberto, Rafael, Magno e Cleiton – pela farra, amizade e companheirismo.

A todos aqueles que colaboraram e torceram pelo meu sucesso.

BIOGRAFIA

Marcos de Oliveira Pinto, filho de Pedro Pinto Barbosa e Maria das Graças Dantas de Oliveira Pinto, nasceu em São João de Meriti, Estado do Rio de Janeiro, em 23 de janeiro de 1983.

Em outubro do ano de 2006, formou-se em Bacharel em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa – UFV – em Viçosa, Minas Gerais.

Em outubro de 2006, ingressou no Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa – UFV – em Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se à defesa de tese em julho de 2008.

Em agosto de 2008, ingressou no Curso de Doutorado em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa – UFV – em Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se à defesa de tese em agosto de 2012.

Em agosto de 2011, assumiu ao cargo de Analista de laboratório na Embrapa Milho e Sorgo de Sete Lagoas, Minas Gerais.

RESUMO

PINTO, Marcos de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2012. **Expressão e substituição alélica dos genes de dessaturases de ácidos graxos em soja.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros, Coorientadores: Maurílio Alves Moreira e Humberto Josué de Oliveira Ramos.

A utilização de métodos de melhoramento genético pode levar à obtenção de genótipos de soja com características de interesse econômico e composição ideal de ácidos graxos na fração óleo. Para isso, é necessário o maior entendimento dos mecanismos que levam à alteração do conteúdo de ácidos graxos frente a diferentes condições de cultivo e a avaliação das substituições dos alelos dos genes que controlam essas características. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da temperatura no conteúdo de óleo, composição de ácidos graxos e expressão gênica das ω -6 e ω -3 dessaturases em genótipos contrastantes para o conteúdo de ácido oléico e linolênico e avaliar o efeito da substituição alélica das ω -3-dessaturases de ácidos graxos insaturados em soja, com base em marcadores SNPs. Para os experimentos do efeito da temperatura na via de biossíntese de ácidos graxos, foram utilizados os genótipos: CD219, variedade comercial com concentrações normais de ácido oléico (~19%) e ácido linolênico (~8%); A29, com baixa concentração de ácido linolênico (~1%) e FA22, com elevada concentração de ácido oléico (~50%). O experimento foi conduzido em duas casas de vegetação: i) com aquecimento, que permitiu a obtenção de temperaturas médias (máxima e mínima) de 32/27°C; ii) sem aquecimento, que permitiu a obtenção de temperaturas médias de 26/14°C. As sementes em desenvolvimento foram subdivididas em dez estádios de acordo com o seu peso úmido, tendo o valor de incremento entre estádios de 50 mg. O conteúdo de óleo foi determinado no extrator *soxhlet* e composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa. Os possíveis genes das dessaturases foram identificados no banco de dados *Phytozome* e a partir dessas sequências foram desenhados *primers* para experimentos de expressão gênica nas sementes dos 5° e 8° estádios de desenvolvimento. Não foi observado efeito significativo da temperatura de cultivo no teor de óleo bruto em sementes maduras dos genótipos CD219, A29 e FA22. Os perfis do acúmulo de ácidos graxos insaturados

durante a ontogenia das sementes variaram em função do genótipo. FA22 apresentou maior conteúdo de ácido oléico e menor conteúdo de ácido linolênico em sementes cultivadas em alta temperatura em todos os estádios de desenvolvimento. Enquanto que em CD219 esse efeito foi observado apenas nos estádios finais. Quinze genes foram identificados como potenciais constituintes da família das dessaturases: 8 referentes às ω -6-dessaturases e 7 referentes às ω -3-dessaturases. Dentre os genes das ω -6-dessaturases Glyma10g42470 e Glyma20g24530 apresentaram maior expressão relativa em sementes de soja em desenvolvimento. Dentre os genes das ω -3-dessaturases genes Glyma02g39230; Glyma14g37350 e Glyma18g06950 apresentaram os maiores valores de expressão relativa em sementes de soja em desenvolvimento. Contrariamente ao esperado, os genes das ω -6-dessaturases Glyma10g42470, Glyma15g23200 e Glyma20g24530 apresentaram maior acúmulo de transcritos na maior temperatura (32/27°C) de cultivo. O gene da ω -3-dessaturases Glyma18g06950 apresentou perfil de expressão compatível com as alterações no conteúdo de ácido linoléico/linolênico nos genótipos FA22 e CD219 em função da temperatura em sementes em desenvolvimento. Para o experimento de avaliação do efeito da substituição alélica das ω -3-dessaturases de ácidos graxos insaturados em soja com base em marcadores SNPs, foram genotipadas 185 progênies F₂ derivadas do cruzamento entre A29 (mutante para três genes FAD3, 1% de 18:3 Δ ^{3,6,9}) e Tucunaré (genótipo normal, 11% de 18:3 Δ ^{3,6,9}). Os resultados demonstram que os marcadores moleculares para os genes FAD3A, FAD3B e FAD3C foram eficientes no monitoramento do conteúdo de ácido linolênico nas populações segregantes F₂ e F_{2.3}. Além disso, as substituições dos alelos no loco FAD3A proporcionam maiores variações no conteúdo de ácido linolênico que as substituições nos outros dois locos. A partir desses dados, espera-se que seja possível introduzir os alelos recessivos dos genes FAD3A, FAD3B e FAD3C da linhagem A29 em genótipos elites do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja (PMQS) do BIOAGRO/UFV e desenvolver linhagens de soja especiais para a agroindústria apresentando baixos teores do ácido linolênico.

ABSTRACT

PINTO, Marcos de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2012.
Expression and allelic substitution of fatty acid desaturases genes in soybean.
Advisor: Everaldo Gonçalves de Barros, Co-advisors: Maurílio Alves Moreira and Humberto Josué de Oliveira Ramos.

The use of genetic breeding may lead to the development of soybean genotypes with traits of economic interest and improved composition of fatty acids in the oil fraction. To achieve this goal, a better understanding of the mechanisms that lead to changes in fatty acid contents under different growing conditions and evaluation of allelic substitutions of genes that control these traits are needed. In this context, the aim of this study was to evaluate the effect of temperature on oil content, fatty acid composition and gene expression of ω -6 and ω -3 desaturases in genotypes contrasting for oleic and linolenic acid contents. In addition, the effect of allelic substitutions of fatty acid ω -3-desaturases genes was also evaluated. For the experiments on the effect of temperature on fatty acid biosynthesis the following genotypes were used: CD219, commercial variety with normal concentrations of oleic acid (~ 19%) and linolenic acid (~ 8%); A29, with low concentration of linolenic acid (~ 1%) and FA22, with a high concentration of oleic acid (~ 50%). The experiment was conducted in two greenhouses: one with heating, with average temperatures (maximum and minimum) of 32/27 °C, and the other with no heating, with average temperatures of 26/14 °C. The developing seeds were divided into ten stages according to the fresh weight, and the increment value between stages of 50 mg. The oil content was determined by soxhlet extractor and the fatty acid composition by gas chromatography. Possible desaturase genes were identified in the Phytozome database and from these sequences primers were designed for gene expression experiments. There was no significant effect of temperature on oil content in mature seeds of genotypes CD219, A29 and FA22. The accumulation profiles of the unsaturated fatty acids during seed ontogeny varied according the genotype. FA22 showed higher oleic and low linolenic acid contents in plants grown under high temperature at all stages of development. While in CD219 this effect was observed only in the later stages. Fifteen genes were identified as potential components of the desaturase family: 8 for ω -6-desaturases and 7 for ω -3 desaturases. Among the ω -6-

desaturase genes, Glyma10g42470 and Glyma20g24530 showed higher relative expression in developing soybean seeds. Among the genes of ω -3-desaturase genes, Glyma02g39230, Glyma14g37350 and Glyma18g06950 showed higher relative expression during seed development. Contrary to expectation, ω -6-desaturases genes Glyma10g42470, Glyma15g23200 and Glyma20g24530 showed higher accumulation of transcripts under higher temperatures (32/27 °C). The ω -3-desaturase gene Glyma18g06950 showed expression profile compatible with the changes in the linoleic/linolenic acid contents of genotypes FA22 and CD219 as a function of temperature during seed development. To evaluate the effect of allelic substitution of ω -3 desaturases genes SNP markers were genotyped in 185 F₂ and F_{2:3} progenies derived from a cross between A29 (mutant for the three FAD3 genes, 1% 18:3 Δ ^{3,6,9}) and Tucunaré (normal genotype, 11% 18:3 Δ ^{3,6,9}). The results demonstrate that the molecular markers for genes FAD3A, FAD3B and FAD3C were efficient in monitoring the linolenic acid content in segregating populations F₂ and F_{2:3}. In addition, substitutions at the FAD3A locus provided greater variations in the linolenic acid content than substitutions in the other two loci. From these data, it is expected that it is possible to introduce the recessive alleles of genes FAD3A, FAD3B and FAD3C of A29 in elite genotypes of the Breeding Program for Soybean Quality of BIOAGRO/UFV and to develop special soybean lines for the agroindustry with low linolenic acid content.

SUMÁRIO

1	Introdução geral	1
2	Revisão de literatura	4
2.1	Importância econômica do óleo de soja	4
2.2	Composição de ácidos graxos do óleo e estabilidade oxidativa	5
2.3	Biossíntese de ácidos graxos	7
2.4	Regulação da biossíntese de ácidos graxos insaturados	11
2.4.1	Regulação transcricional	11
2.5	Marcadores moleculares	15
3	Referências bibliográficas.....	17
Capítulo I – Acúmulo de transcritos dos genes das ω-6 e ω-3 dessaturases de ácidos graxos em sementes de soja cultivadas em diferentes temperaturas		
1	Resumo	23
2	Introdução.....	24
3	Material e métodos	26
3.1	Material genético	26
3.2	Condições de cultivo	26
3.3	Determinação da concentração de óleo total.....	27
3.4	Determinação das concentrações dos ácidos graxos	27
3.4.1	Expressão gênica das ω -6 e ω -3 dessaturases	27
3.4.2	Síntese de cDNA	28
3.4.3	Identificação e caracterização <i>in silico</i> dos genes das ω -6 e ω -3 dessaturases	29
3.4.4	Análise do acúmulo de transcritos das ω -6 e ω -3 dessaturases	30
3.5	Análise estatística	31
4	Resultados e discussão	32
4.1	Conteúdo de óleo	32
4.2	Conteúdo de ácidos graxos insaturados.....	33
4.3	Expressão gênica das ω -6 e ω -3 dessaturases	39
4.3.1	Obtenção das seqüências.....	39

4.3.2	Análise de expressão <i>in silico</i>	44
4.3.3	Acúmulo de transcritos das ω -6 e ω -3 dessaturases	47
5	Conclusões.....	61
6	Referências bibliográficas.....	62
Capítulo II – Avaliação do efeito da substituição alélica das ω-3-dessaturases		
de ácidos graxos insaturados em soja com base em marcadores SNPs		
1	Resumo	67
2	Introdução.....	67
3	Material e métodos	69
3.1	Material genético	69
3.2	Determinação do conteúdo de ácido linolênico	69
3.3	Extração de DNA	70
3.4	Genotipagem.....	70
3.5	Análises estatísticas	71
4	Resultados e discussão	71
5	Conclusões.....	78
6	Perspectivas.....	78
7	Referências bibliográficas.....	79

1 Introdução geral

Dentre os óleos de origem vegetal, o de soja é o segundo mais consumido no mundo. Ele pode ser utilizado de forma direta e indireta na alimentação humana e animal ou como fonte de matéria prima de produtos derivados, como o biodiesel e vários outros subprodutos.

O Brasil é o quarto maior produtor e segundo maior exportador de óleo de soja do mundo. A produção brasileira de óleo de soja tem tido um rápido crescimento e a previsão é que nos próximos anos o país se torne o segundo ou terceiro maior produtor desse óleo vegetal. A expansão das fronteiras agrícolas, associada ao desenvolvimento de variedades mais produtivas e adaptadas às diversas regiões e condições ambientais, corroboram essa perspectiva.

O óleo de soja é extraído de grãos maduros, que são compostos basicamente por 40% de proteínas e 20% de lipídeos. A classe de lipídeos mais abundante nas sementes dessa leguminosa são os triacilgliceróis, moléculas constituídas do glicerol esterificado a três ácidos graxos. Os principais ácidos graxos encontrados no óleo são: ácido palmítico (16:0) - 10%, ácido esteárico (18:0) - 3%, ácido oléico (18:1 Δ^9) - 20%, ácido linoléico (18:2 $\Delta^{9,12}$) - 57% e ácido linolênico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$) - 10%; podendo ser encontrados mutantes com teores alterados desses compostos.

A composição de ácidos graxos na molécula de triacilglicerol é um fator determinante nas propriedades físico químicas do óleo e de seus subprodutos. Óleos de soja com elevados teores de ácidos graxos polinsaturados – linoléico e linolênico – são mais suscetíveis à hidroxidação, que resulta em cetonas e aldeídos voláteis, os quais alteram a sua qualidade e sabor. No caso do biodiesel, a utilização de óleos de soja com alto teor de ácidos graxos insaturados leva à produção de um combustível de qualidade inferior, com baixo índice de cetano e alta instabilidade oxidativa.

Algumas alternativas têm sido utilizadas para alterar a composição de ácidos graxos no óleo, dentre elas se destaca a hidrogenação parcial do óleo. No entanto, esse processo aumenta o custo de produção do óleo e leva à formação de ácidos graxos trans como subprodutos. Os ácidos graxos trans aumentam o risco de doença arterial coronariana, uma vez que modulam a síntese e efeito do colesterol e de eicosanóides. Desta forma, órgãos de saúde vêm recomendando a redução do consumo de alimentos que contenham ácidos graxos trans.

Por meio do melhoramento genético novas cultivares de soja com composição alterada de ácidos graxos podem ser obtidas, sem a necessidade da hidrogenação química. O Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja (PMQS) do BIOAGRO/UFV possui diferentes acessos com baixo teor do ácido linolênico e alto teor do ácido oléico. Entre eles, destacam-se a variedade FA22, que possui cerca de 50% de ácido oléico, e o genótipo A29, que possui 1% de ácido linolênico. O cruzamento desses genótipos mutantes com cultivares elites tem levado à obtenção de populações com considerável aumento do teor de ácido oléico e redução de ácido linolênico.

No entanto, para maximizar o processo de produção de genótipos superiores com conteúdo de ácidos graxos adequado é essencial a caracterização das vias bioquímicas que regulam a sua biossíntese, levando em consideração os fatores genéticos, ambientais e a interação entre ambos.

A via de biossíntese de ácidos graxos polinsaturados em sementes de soja envolve as enzimas dessaturases, principalmente as do retículo endoplasmático (microsoma). Os principais substratos para essas enzimas são os resíduos de ácidos graxos ligados à fosfatidil colina (PC). A ω -6-dessaturase converte oleil em linoleil, enquanto a ω -3-dessaturase é responsável pela conversão de linoleil em linolenil.

Alguns genes candidatos já foram caracterizados como sendo os que codificam tais dessaturases em soja. Nas sementes de soja, vários estudos indicam que os principais genes responsáveis pela biossíntese de ácidos graxos de reserva são o GmFAD3A, que codifica uma ω -3-dessaturase, e o FAD2-1, que codifica uma ω -6-dessaturase. No entanto, o número exato de genes que controla a via de biossíntese de ácidos graxos insaturados ainda é incerto e os seus efeitos individuais e aditivos não estão bem caracterizados.

Além dos componentes genéticos, os fatores ambientais exercem forte influência no conteúdo de óleo e na composição de ácidos graxos da fração óleo. Dentre os fatores ambientais, destaca-se a temperatura de cultivo da planta durante o desenvolvimento da semente. De um modo geral, o aumento da temperatura resulta na redução dos conteúdos de ácido linoléico e linolênico, e um significativo aumento no conteúdo do ácido oléico.

A elucidação da regulação na via de biossíntese de ácidos graxos em genótipos contrastantes cultivados sob diferentes temperaturas poderá fornecer informações de suma importância para o melhor entendimento dos mecanismos que culminam no conteúdo final de ácidos graxos em sementes de soja. Além disso, tais informações poderão ser utilizadas em diferentes abordagens biotecnológicas para o melhoramento da soja visando à qualidade do óleo.

Uma das aplicações do conhecimento obtido é o desenvolvimento e uso de marcadores moleculares associados ao conteúdo de ácidos graxos na seleção assistida para acelerar o processo de obtenção de genótipos de soja superiores com maior estabilidade oxidativa, atendendo à demanda das indústrias de óleo e biodiesel.

O presente trabalho está inserido no PMQS e tem como objetivos gerais avaliar o efeito da temperatura de cultivo na composição de ácidos graxos, no conteúdo de óleo e na expressão gênica das ω -6 e ω -3 dessaturases nos genótipos CD219, A29 e FA22 e avaliar o efeito das substituições alélicas dos genes de efeito maior na via de biossíntese de ácido linolênico em genótipos elites do PMQS, para a validação dos marcadores SNPs de A29 nos genótipos adaptados às condições de cultivo do Brasil.

2 Revisão de literatura

2.1 Importância econômica do óleo de soja

O óleo de soja é o segundo tipo de óleo vegetal mais consumido do mundo, correspondendo a cerca de 30% do total mundial (Soystats, 2012). Os principais países produtores do óleo de soja são Estados Unidos, China, Argentina e Brasil, representando, respectivamente, cerca de 25%, 19%, 18% e 16% da produção mundial (Icex, 2012). O Brasil é o segundo maior exportador mundial, sendo responsável por cerca de 22% de todo óleo de soja exportado. A previsão para 2012 é que o Brasil exporte 1,3 milhões de toneladas de óleo, representando mais de 1,5 bilhões de dólares na balança comercial brasileira (Abiove, 2012).

O óleo de soja bruto pode ser processado em três produtos básicos: óleo refinado comestível, óleo refinado para fins não alimentares e lecitina. O óleo refinado comestível é a matéria-prima para a produção de margarinas, gordura vegetal, óleo de cozinha, maionese e temperos para salada. O óleo refinado para fins não alimentares é destinado à produção de velas, desinfetantes, sabões, vernizes, tintas, plásticos e lubrificantes. Enquanto que a lecitina é muito utilizada em confeitos, chocolates, sorvetes, alimentos que vão ao forno, produtos químicos, cosméticos e têxteis (Corol, 2012).

Nos últimos anos, as mudanças climáticas associadas à liberação de gases resultantes da queima de combustíveis fósseis, o alto preço internacional do petróleo e a preocupação com o desenvolvimento sustentável estão levando à criação de novas vertentes de mercado, entre as quais destaca-se a produção de biodiesel (Schuchardt *et al.*, 2001).

A produção anual global de biodiesel, a partir de diferentes fontes de matéria prima, está em torno de 6 bilhões de litros e representa cerca de 10% de toda a produção de biocombustíveis. Os principais países produtores de biodiesel são Alemanha (48%), outros países europeus (30%), EUA (15%), Brasil, China, Índia, Canadá, Colômbia e Malásia (Nogueira, 2010).

Em 2004, foi lançado, pelo Governo Federal Brasileiro, o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), que prevê a adição de biodiesel ao diesel

convencional. No ano de 2005 a lei nº 11097 estabeleceu percentuais mínimos de mistura de biodiesel ao diesel, e o monitoramento da inserção do novo combustível no mercado. Por essa lei será obrigatória a adição de 5 a 20% de biodiesel ao diesel convencional (biodiesel B5-B20), até 2013. Com isso a meta de produção de biodiesel para o ano de 2013 é de 2,40 bilhões de litros, tendo basicamente como matéria prima o óleo de soja (Portal do Biodiesel, 2012).

2.2 Composição de ácidos graxos do óleo e estabilidade oxidativa

O óleo de soja é composto basicamente de moléculas de triacilgliceróis (95 a 97%), ésteres derivados da condensação do glicerol com três ácidos graxos. Os principais ácidos graxos encontrados no óleo são: ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1 Δ^9), ácido linoléico (18:2 $\Delta^{9,12}$) e ácido linolênico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$) (Fehr, 2007). Normalmente, os ácidos graxos saturados (16:0 e 18:0) ocupam as posições sn-1 e sn-3 da cadeia do glicerol e os ácidos graxos insaturados (18:1 Δ^9 , 18:2 $\Delta^{9,12}$ e 18:3 $\Delta^{9,12,15}$) ocupam a posição sn-2 (Fatemi & Hammond, 1977).

A composição de ácidos graxos na fração óleo é genótipo-específica. Mas como a base genética das cultivares comerciais de soja é bastante estreita (Hiromoto & Vello, 1986), a sua composição de ácidos graxos não apresenta grande variação: 12% de ácido palmítico, 4% de ácido esteárico, 23% de ácido oléico, 53% de ácido linoléico e 8% de ácido linolênico (Lee *et al.*, 2007; Fehr, 2007).

As propriedades físico-químicas e biológicas do óleo são diretamente afetadas por sua composição de ácidos graxos. A diversificação do uso do óleo de soja tem demandado o desenvolvimento de novas cultivares com composição centesimal modificada, de acordo com as características do produto final. Especificamente para óleos destinados a frituras existe grande interesse no aumento do conteúdo de ácido oléico e redução dos ácidos linoléico e linolênico, visando principalmente o aumento da sua estabilidade oxidativa (Lee *et al.*, 2007; Gerde *et al.*, 2007; Fehr, 2007).

O maior número de duplas ligações nos ácidos graxos poli-insaturados faz com que eles sejam mais suscetíveis a degradações hidrolíticas e oxidativas. As enzimas lipoxigenases são responsáveis pela hidroperoxidação de ácidos graxos que contenham o grupo 1,4 cis-cis pentadieno. A partir do ácido linolênico, por exemplo, são formados hidroperóxidos C9 e C13 com possibilidades de estereoquímica R ou S. Os

hidroperóxidos podem sofrer ações de outras enzimas que promovem a quebra da ligação próxima ao grupo hidroxila, formando compostos aldeídos o que altera a cor e aroma do óleo e dos alimentos derivados da soja (Robinson *et al.*, 1995; Liavonchanka & Feussner, 2006; Andreou & Feussner, 2009).

Os processos de rancidez hidrolítica e oxidativa são acelerados pelo aumento da temperatura. A rancidez hidrolítica leva à liberação do ácido graxo da molécula de triacilglicerol, aumentando a acidez do óleo. A rancidez oxidativa provoca a oxidação da dupla ligação formando aldeídos e cetonas de cadeia curta, o que torna o óleo escuro, viscoso e com odor desagradável (Costa Neto *et al.*, 2000; Farhoosh *et al.*, 2009).

Óleos de soja refinados com teores reduzidos de ácido linolênico – 1,5% e 2,6% – utilizados em frituras por 23 dias, com tempo de fritura diária de 6 horas, apresentaram porcentagens inferiores de compostos polares e de compostos dienólicos conjugados comparados ao óleo refinado controle contendo 5,3% de ácido linolênico. O tempo de vida útil do óleo com reduzidos teores de ácido linolênico foi superior ao do controle em dois dias. Além disso, o sabor amanteigado diminuiu e o sabor rançoso aumentou no decorrer do tempo de fritura, sendo essas características mais perceptíveis no óleo controle (Gerde *et al.*, 2007).

A qualidade do biodiesel também sofre influência da composição de ácidos graxos do óleo utilizado como matéria prima. Além de reduzir a estabilidade oxidativa, os elevados teores de ácidos graxos polinsaturados reduzem o número de cetano, levando à menor qualidade de ignição do combustível (Knothe, 2007; Ramos *et al.*, 2009).

Historicamente, a indústria alimentícia tem buscado a melhoria da estabilidade oxidativa do óleo de soja via hidrogenação parcial, porém, esse processo leva à formação de ácidos graxos do tipo trans, que são prejudiciais à saúde (Dorfman *et al.*, 2009). A hidrogenação parcial parece também não ser uma alternativa viável para o biodiesel, pois o uso de óleo hidrogenado leva à obtenção de um biodiesel com baixas propriedades de fluxo a frio (Wadumesthrige *et al.*, 2009).

A identificação e o desenvolvimento de genótipos de soja mutantes têm permitido a obtenção de cultivares superiores com conteúdo de ácidos graxos mais apropriados para diversos fins (Fehr, 2007). Porém, para maximizar o processo de melhoramento é

essencial o entendimento dos mecanismos de regulação da via de produção de ácidos graxos insaturados em vegetais superiores.

2.3 Biossíntese de ácidos graxos

A biossíntese de ácidos graxos envolve pelo menos três compartimentos celulares: plastídeo, citosol e retículo endoplasmático. A via inicial da síntese de ácidos graxos, conhecida como “*síntese de novo*”, ocorre no plastídeo (via procariótica) (Figura 1). Nesta via, a enzima acetil-CoA carboxilase converte acetil-CoA e CO₂ a malonil-CoA, em uma reação dependente de ATP. O malonil-CoA produzido é transferido para a proteína carreadora de grupos acil (ACP). A partir dessa etapa, todas as reações subsequentes envolvem a via ACP até a produção de ácidos graxos de 16 ou 18 carbonos, que serão exportados para o citosol ou seguirão a via plastidial do glicerol-3-fosfato (Ohlrogge & Browseb, 1995; Millar *et al.*, 2000).

Após transferência ao ACP, o malonil-ACP participa de uma reação de condensação com o acetil-CoA, resultando na formação de uma ligação carbono-carbono e liberação do CO₂. Pelo menos três enzimas de condensação separadas são necessárias durante o processo de formação de um ácido graxo de 18 carbonos. A primeira condensação de acetil-CoA e malonil-ACP para formar um produto de quatro carbonos é catalisada pela 3-cetoacil-ACP sintase III (KASIII). A segunda enzima de condensação, KASI, é responsável pela elongação da cadeia de 6 até 16 carbonos. Por fim, a condensação do palmitoil-ACP a esteroil-ACP é catalisada pela KASII (Baud & Lepiniec, 2010).

Três reações adicionais ocorrem após cada condensação para a formação de um ácido graxo saturado. O grupo carbonil do 3-cetoacil-ACP é reduzido pela enzima 3-cetoacil-ACP redutase, que utiliza NADPH como doador de elétrons. A reação seguinte é a desidratação pela hidroxiaçil-ACP desidratase. O ciclo termina com a enoil-ACP redutase, que utiliza NADH ou NADPH para reduzir ligações duplas em posição *trans*, formando um ácido graxo saturado. A ação combinada destas quatro reações promove o alongamento do precursor de ácido graxo em dois carbonos por ciclo. Ainda no plastídeo, pode ocorrer a introdução de uma dupla ligação catalisada pela enzima solúvel esteroil-ACP dessaturase (Wallis *et al.*, 2002; Ohlrogge & Browseb, 1995).

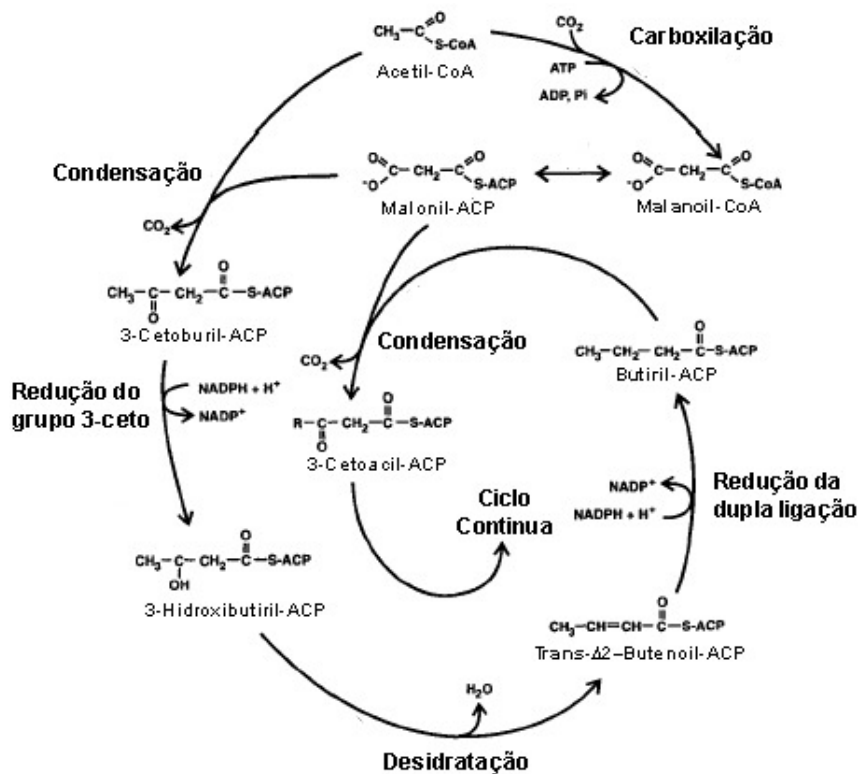


Figura 1: Reações de biossíntese de ácidos graxos saturados. Adaptado de Ohlrogge & Browse (1995).

A elongação dos ácidos graxos no plastídio é finalizada quando o grupo do acil é removido do ACP. O ácido graxo pode ser exportado para o citosol, onde é esterificado formando um *pool* de acil-CoA. Essas moléculas são transportadas para o interior do retículo endoplasmático pelas aciltransferases para a produção de lipídeos de membrana e armazenamento (Millar *et al.*, 2000).

A glicerol-3-fosfato aciltransferase (TAPG) transfere o grupo acetil do acetil-Coa para a posição *sn-1* do glicerol-3-fosfato produzindo ácido lisofosfatídico (LPA). Em seguida, a 1-aciltransferase acil-glicerol-3-fosfato transfere outro grupo acil do acil-Coa para a posição *sn-2* do ácido lisofosfatídico, formando o ácido fosfatídico (PA). A defosforilação do ácido fosfatídico por fosfatases de ácido fosfatídico (PAP) leva à formação do diacilglicerol (DAG), que pode ser acetilado pela diacilglicerol aciltransferase (DAGAT) na posição *sn-3* para a produção dos triacilgliceróis (TAG). Alternativamente, o ácido fosfatídico e o diacilgliceróis podem ser utilizados como precursores dos principais glicerolipídeos de membranas (Millar *et al.*, 2000).

Antes de serem convertidos nos produtos finais, os ácidos graxos podem sofrer alguns tipos de modificações, como: dessaturação, epoxidação e hidroxilação (Millar *et al.*, 2000). A introdução de duplas ligações nos ácidos graxos é catalisada pelas dessaturases. Essas enzimas são classificadas em duas grandes classes, as solúveis e as ligadas à membrana do retículo endoplasmático. Dessaturases solúveis representam um grupo pequeno de enzimas que possuem dois motivos conservados de histidina e ferro (Shanklin & Cahoon, 1998). Elas adicionam uma dupla ligação em ácidos graxos ligados à proteína carreadora de grupos acil (ACP). A proteína mais importante desse grupo é a Δ -9-estearoil-ACP dessaturase (ω -9-dessaturase) (Dyer *et al.*, 2002).

O produto da reação da ω -9-dessaturase é o ácido oléico ligado à ACP. Este se encontra nos cloroplastos, podendo ser transportado para o citosol e esterificado a fosfatidil colina (PC) ou até mesmo permanecer no plastídeo e ser transferido para o diacilglicerol e subsequentemente, para um galactolípídeo (Yadav, 1996).

As próximas adições de insaturações são catalisadas pelas dessaturases de membranas. Essas enzimas possuem quatro domínios transmembrana e três regiões ricas em histidina ligadas coordenadamente a dois átomos de ferro, que compõem o seu sítio ativo (Figura 2) (Dyer *et al.*, 2002; Millar *et al.*, 2000).

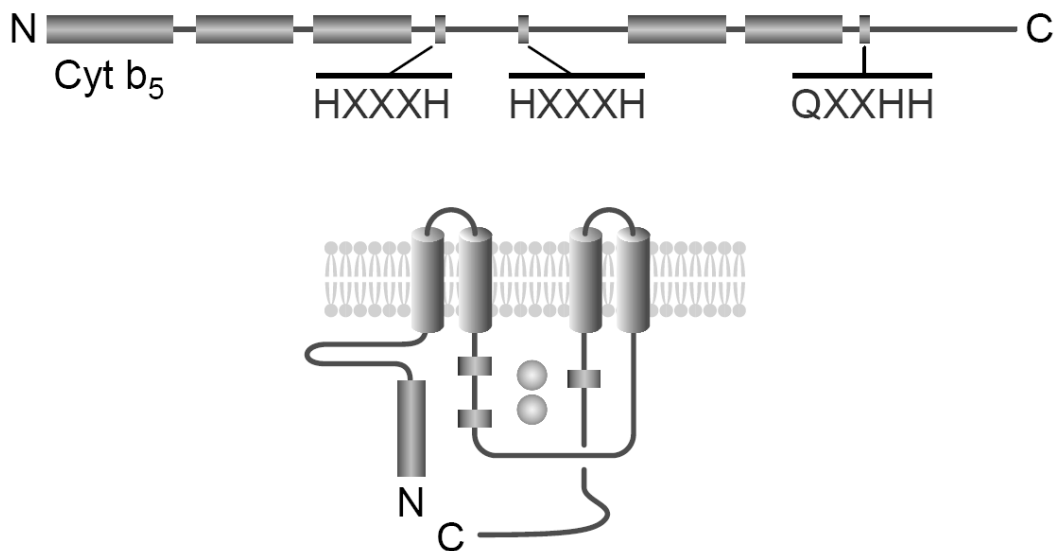


Figura 2: Topologia das principais dessaturases de membranas. Adaptado de Wallis *et al.* (2002).

As dessaturases de membranas de plantas atuam em duas vias para a produção de ácidos graxos insaturados, a via plastidial e a via do retículo endoplasmático (Figura 3). As duas vias são dependentes de O₂, mas apresentam algumas particularidades. No retículo endoplasmático o doador de elétrons é o citocromo b₅, enquanto que no plastídio, é a ferredoxina. Outra diferença encontrada refere-se ao substrato primário, que no plastídeos são os galactolipídeos (GL) e no retículo endoplasmático são os ácidos graxos ligados à fosfatidil colina (PC). As principais classes das dessaturases de membranas são as ω-6-dessaturases, que convertem ácido oléico em linoléico, e as ω-3-dessaturases, responsáveis pela síntese de ácido linolênico a partir do ácido linoléico (Yadav, 1996).

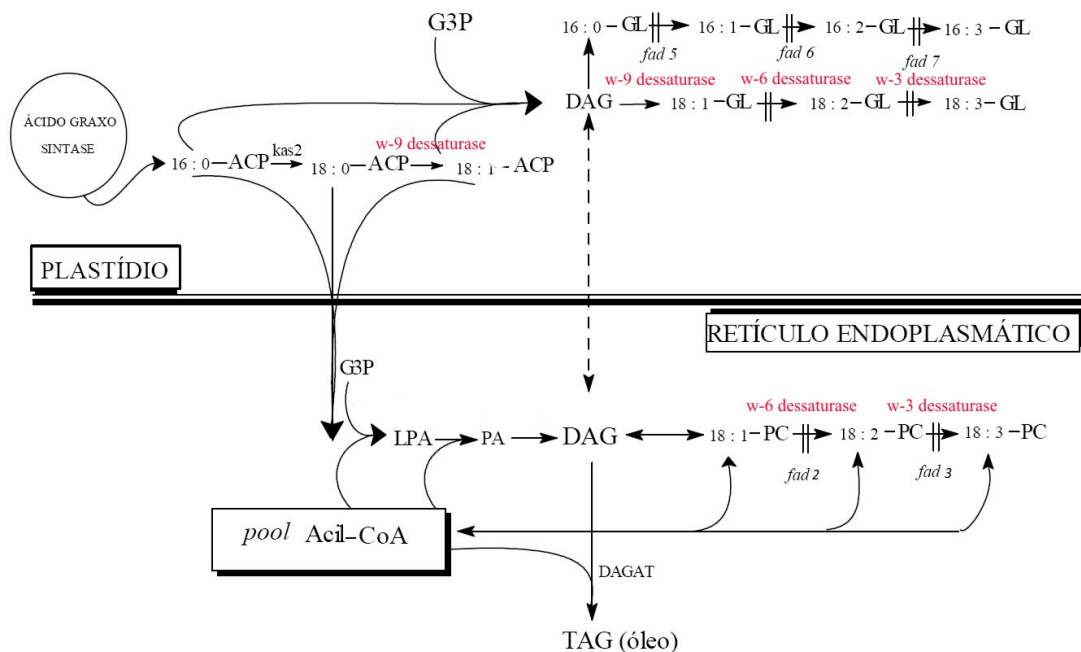


Figura 3: Vias de produção de ácidos graxos polinsaturados em plantas superiores. Em vermelho estão destacadas as principais dessaturases responsáveis pela produção de ácidos graxos insaturados. Adaptado de Yadav (1996).

Algumas ω-6 dessaturases do retículo endoplasmático possuem atividades alternativas. Dessaturases encontradas em mamona (*Ricinus communis*) convertem oleato a (R)-12-hidroxiestearato, e enzimas encontradas em *Lesquerellas* possuem um sistema bifuncional produzindo uma mistura de 12-hidroxiestearato e um produto 12-monoenoíco (Van de Loo *et al.*, 1995). As atividades de 12-hidroxilação e 12-

dessaturação estão intimamente ligadas, dessa forma, sugere-se que ambas as reações enzimáticas sejam realizadas no mesmo sítio ativo (Buist & Behrouzian, 1998; Behrouzian *et al.*, 2001).

2.4 Regulação da biossíntese de ácidos graxos insaturados

A composição final de ácidos graxos é determinada por fatores genéticos, ambientais e pela interação entre ambos. Dentre os fatores ambientais, podem ser citados: a luz, a temperatura, poluentes atmosféricos, a concentração de sal e de compostos xenobióticos no solo (Harwood, 1997).

Em sementes de soja expostas a altas intensidades de radiação solar foi verificado o aumento nos teores totais de óleo e de ácido oléico (Izquierdo *et al.*, 2009). Modificações nos teores de ácidos graxos também têm sido observadas em soja cultivada sob elevadas temperaturas, levando ao aumento no conteúdo do ácido oléico e redução no conteúdo dos ácidos linoléico e linolênico. Os conteúdos dos ácidos palmítico e esteárico geralmente são pouco afetados por mudanças nas temperaturas de cultivo (Oliva *et al.*, 2006).

2.4.1 Regulação transcricional

Um dos primeiros estudos para a caracterização dos genes das ω -6-dessaturases foi realizado em 1996. Neste trabalho, os autores descreveram a existência de dois genes microssomais para ω -6-dessaturases em soja, FAD2-1 e FAD2-2. O gene FAD2-1 é altamente expresso em sementes em desenvolvimento e codifica uma ω -6-dessaturase que participa da síntese de ácidos graxos de armazenamento em sementes. Já o gene FAD2-2 é expresso constitutivamente em todos os órgãos da planta e codifica uma ω -6-dessaturase responsável pela produção de ácidos graxos de membrana. Frente a variações climáticas, os níveis de transcritos FAD2-1 e FAD2-2 permaneceram praticamente constantes em plantas cultivadas em três faixas de temperatura, 28/22°C, 22/18°C e 18/12°C. Porém, na faixa de temperatura mais elevada (32/28°C) o acúmulo de transcritos desses genes foi superior, contrariamente aos resultados teoricamente esperados (Heppard *et al.*, 1996).

No genótipo de soja mutante FA22, com 50% de ácido oléico, os níveis de acúmulo de transcritos de FAD2-1 e FAD2-2 também não tiveram correlação com o

conteúdo desse ácido graxo. Assim, possivelmente, outros genes podem estar envolvidos na regulação da via de biossíntese de ácido oléico nesse genótipo (Pinto, 2008).

Tang *et al.* (2005) descreveram a existência de mais um gene que codifica ω -6-dessaturase em soja, designado de FAD2-1B. FAD2-1A (anteriormente descrito como FAD2-1) e FAD2-1B possuem 93,8% de nucleotídeos idênticos e diferem em apenas 24 resíduos de aminoácidos na proteína final. A expressão heteróloga desses genes em leveduras revelou que FAD2-1A é mais instável que FAD2-1B, especialmente quando culturas foram mantidas em elevadas temperaturas de crescimento.

Os resultados observados em levedura foram confirmados em soja (Byfield & Upchurch, 2007). Foram avaliados os transcritos dos genes FAD2-1A e FAD2-1B em três variedades de soja (Dare, A6 e N01-3544) cultivadas em três faixas de temperatura (22/18, 26/22 e 30/26° C). Na faixa de temperatura mais baixa, os níveis de FAD2-1B foram 2 a 10 vezes maiores do que os de FAD2-1A, em sementes com 35 dias após florescimento. A redução do nível de transcrito de FAD2-1A e FAD2-1B com o aumento da temperatura foi positivamente correlacionado com o aumento no conteúdo de ácido oléico e redução no conteúdo de ácido linolênico, nas três variedades, evidenciando que esses genes respondem a modificações na temperatura.

Estudos realizados por Schlueter *et al.* (2007) comprovaram que os genes FAD2 constituem uma família gênica. Segundo os autores, nessa família existem pelo menos cinco membros distintos, denominados FAD2-1A, FAD2-1B, FAD2-2A, FAD2-2B (anteriormente designado FAD2-2) e FAD2-2C. Esses genes já foram identificados nos grupos de ligação propostos por Cregan *et al.* (1994). FAD2-1A foi mapeado no grupo de ligação O, FAD2-1B, no grupo de ligação I, e FAD2-2A e FAD2-2B, no grupo de ligação L. FAD2-1A e FAD2-1B mostram indícios de *splicing* alternativo no códon inicial de metionina. Os transcritos que possuem o códon para esse aminoácido foram denominados FAD2-1A_S e FAD2-1B_S, e os que não apresentavam esse códon, FAD2-1A_L e FAD2-1B_L.

A quantificação dos transcritos desses genes na cultivar de soja William 82 evidenciou padrões diferenciados de acúmulo nas vagens, cotilédones, folhas e raiz. Os transcritos de FAD2-2A não foram detectados em nenhum tecido avaliado, indicando que este gene não é expresso nesses tecidos ou que não é funcional. Os transcritos de FAD2-1 (FAD2-1A_L, FAD2-1A_S, FAD2-1B_L e FAD2-1B_S) não foram detectados

nos estádios iniciais de desenvolvimento da semente, mas foram detectados nos estádios intermediários e tardios. Os transcritos de FAD2-2B (FAD2-2) foram detectados em todos os tecidos e durante todo o desenvolvimento da semente. Análises comparativas em duas condições de temperatura (32/28°C e 18/12°C) mostraram um aumento significativo do nível do transcrito do gene FAD2-2C em baixa temperatura, indicando que este também é responsável pelas mudanças nos conteúdos de ácidos graxos em resposta a alterações na temperatura (Schlueter *et al.*, 2007).

Um sexto membro da família FAD2, FAD2-3, foi caracterizado por Li *et al.* (2007). Experimentos de PCR semi-quantitativo em vários tecidos e ao longo do desenvolvimento das sementes revelaram que FAD2-3 é um gene de expressão constitutiva. A avaliação do acúmulo de transcritos dos genes das dessaturases em sementes de soja da variedade Meng8206 cultivadas em diferentes faixas de temperatura (32/28°C, 28/22°C, 18/12°C e 12/8°C) mostrou que variações de temperatura não provocam alteração no nível de transcritos de FAD2-3. Esses resultados evidenciam que esse gene também não responde a mudanças de temperatura.

Um grande número de genes também tem sido descrito para as ω -3-dessaturases. Bilyeu *et al.* (2003) descreveram inicialmente a presença de três genes que codificam essas dessaturases, denominados GmFAD3A, GmFAD3B e GmFAD3C. Em sementes de soja foram observadas elevada expressão de GmFAD3A e baixa expressão de GmFAD3C. Os transcritos de GmFAD3B não foram detectados. Assim, muito provavelmente, o gene GmFAD3A é o principal responsável pela biossíntese de ácido linolênico em sementes.

Em genótipos de soja com reduzidos teores de ácido linolênico, como A29 (1%) e N85-2176 (3%), foi verificado que a expressão gênica de GmFAD3A foi nula e que o acúmulo de transcritos de GmFAD3B foi nula apenas no genótipo A29, o que indica que GmFAD3B também pode estar relacionado à biossíntese de ácido linolênico em sementes. Não foram observadas alterações nos níveis de transcritos de GmFAD3C, mas não se pode descartar o efeito desse gene na biossíntese de ácidos graxos em sementes (Pinto, 2008).

Outros estudos têm evidenciado a presença de mais genes controlando o conteúdo de ácido linoléico/linolênico. Análises moleculares de linhagens mutantes desenvolvidas no Japão identificaram quatro formas dos genes FAD3, GmFAD3-1a,

GmFAD3-1b, GmFAD3-2a e GmFAD3-2b (Anai *et al.*, 2005). Três deles mostraram-se equivalentes aos descritos anteriormente por Bilyeu *et al.* (2003). O gene GmFAD3-1a é equivalente GmFAD3B, GmFAD3-1b é equivalente a GmFAD3A e GmFAD3-2a é equivalente a GmFAD3C. Os perfis de acúmulo de transcritos desses genes ao longo do desenvolvimento das sementes de soja foram avaliados por PCR semi-quantitativo, que mostrou que os transcritos do gene GmFAD3-1a não foram detectados nos estádios iniciais, os transcritos de GmFAD3-1b e GmFAD3-2a foram detectados em todos os estádios, enquanto que os transcritos do gene GmFAD3-2b só foram detectados nos estádios iniciais.

Em estudos envolvendo diferentes temperaturas de cultivo também têm sido observada a expressão diferencial dos genes GmFAD3. Byfield & Upchurch (2007) avaliaram o efeito de três temperaturas (30/29°C, 26/22°C e 22/18°C) em três genótipos de soja (Dare, N99-3170 e N01-3544) nos níveis de transcritos dos genes GmFAD3A, GmFAD3B, e GmFAD3C. Em sementes com 35 dias após florescimento, o acúmulo de transcrito reduziu de 5 a 15 vezes para o gene GmFAD3A, 2 a 9 vezes para o gene GmFAD3B e 2 a 3 vezes para o gene GmFAD3C em sementes desenvolvidas em um ambiente de temperatura mais elevada (30/26°C ou 30/29°C) vs. ambientes com temperaturas mais amenas (26/22°C) ou mais baixas (22/18°C). A redução nos níveis dos transcritos foi positivamente associada à redução no conteúdo de ácido linolênico nas sementes dos três genótipos analisados. Deste modo, a regulação transcricional da expressão do gene da ω -3-dessaturase, pelo menos em parte, explica as alteração na composição de ácidos graxos em diferentes temperaturas nos genótipos avaliados.

Com a conclusão do sequenciamento do genoma da soja e sua disponibilidade na plataforma *Phytozome* (<http://www.phytozome.net/soybean>), torna-se possível a identificação do número exato de genes que compõem as famílias das ω -3 e ω -6-dessaturases. Aliado a isso, o estudo do nível acúmulo de transcritos de cada membro dessas famílias gênicas utilizando a técnica de PCR quantitativo pode fornecer dados cruciais para o entendimento dos mecanismos de regulação da expressão gênica das dessaturases em diferentes genótipos, estádios de desenvolvimento e temperaturas de cultivo.

Além da regulação transcricional, a expressão gênica pode ser regulada pós-transcricionalmente. Assim, a quantidade de proteína expressa não é necessariamente proporcional à quantidade de seu mRNA correspondente. Desta forma, estudos

proteômicos podem complementar os dados de análise de acúmulo de transcritos, auxiliando na compreensão das redes de funcionamento e regulação que podem levar às alterações nos níveis de ácidos graxos nos grãos de soja cultivados em diferentes temperaturas.

2.5 Marcadores moleculares

A identificação dos genes de efeito maior que controlam a produção de ácidos graxos tem possibilitado o desenvolvimento de marcadores moleculares, acelerando o processo de produção de cultivares elites, com alto teor de ácido oléico e reduzido teor de ácido linolênico (Alt *et al.*, 2005; Champpeil & Bilyeu, 2007; Bilyeu *et al.*, 2006).

Alt *et al.* (2005) identificaram marcadores moleculares associados ao alelo suprimido *ol* do gene *Fad2-1* no mutante de soja M23, que possui teores médios de ácido oléico. Foram feitos cruzamentos entre M23 e Archer, uma cultivar com teor normal de ácido oléico. As 88 plantas F_2 segregaram na proporção de 1:2:1 (*olol*:*Olol*:*OIOI*), sendo que os indivíduos *olol* apresentaram a maior média para o teor de ácido oléico, os indivíduos *Olol* apresentaram níveis intermediários, enquanto que os indivíduos *OIOI* apresentaram menor média. Registrou-se uma grande variação nos teores de ácido oleico entre os indivíduos *olol* com sua distribuição se sobrepondo aos indivíduos *OIOI* e *Olol*, o que confirma que outros genes tem influência na determinação desta característica.

Alguns genótipos mutantes, que possuem baixos níveis de ácido linolênico já tiveram os alelos do gene *GmFAD3A* bem caracterizados, o que permite o desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo SNP (*Single-Nucleotide Polymorphism*). A linhagem PI361088B (3,8% de $18:3\Delta^{3,6,9}$) possui uma inserção de dois resíduos de timidina na posição 310, promovendo mudança do quadro de leitura e conseqüentemente o surgimento de um códon de parada prematuro na posição 328. A mutação no genótipo M5 (3,3% de $18:3\Delta^{3,6,9}$) é similar à de PI3661088B, apresentando também uma mudança no quadro de leitura, no entanto, neste caso ocorre uma deleção de 19 nucleotídeos na posição 1057, resultando em uma proteína com 25 resíduos de aminoácidos a mais na extremidade C-terminal. O genótipo CX1512-44 (3% de $18:3\Delta^{3,6,9}$) apresenta uma mutação de apenas um par de bases na posição 811, exatamente no sítio de *splicing*, o que leva à formação de uma proteína com estrutura

alterada. O genótipo C1640 (3,7% de 18:3 $\Delta^{3,6,9}$) também contém uma mutação de troca de bases, mas esta encontra-se na região codificadora, o códon para triptofano (TGG) no éxon 6 é modificado para um códon de parada (TGA) (Champpell & Bilyeu, 2007).

No genótipo A29 (1% de 18:3 $\Delta^{3,6,9}$) foi possível o desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo SNP para os alelos de três genes de ω -3-dessaturases, GmFAD3A, GmFAD3B e GmFAD3C. Esses marcadores estão associados ao conteúdo de ácido linolênico em populações segregantes e permitiu o desenvolvimento de um novo germoplasma com apenas 1% de ácido linolênico (Bilyeu *et al.*, 2006).

3 Referências bibliográficas

- ABIOVE. Disponível em <<http://www.abiove.com.br/>>, acessado em 20 de abril de 2012.
- ALT, J. L.; FEHR, W. R.; WELKE, G. A.; SANDHU, D. Phenotypic and molecular analysis of oleate content in the mutant soybean line M23. **Crop Science**, v.45, p. 1997–2000, 2005.
- ANAI, T.; YAMADA, T.; KINOSHITA, T.; RAHMAN, S. M.; TAKAGI, Y. Identification of corresponding genes for three low- α -linolenic acid mutants and elucidation of their contribution to fatty acid biosynthesis in soybean seed. **Plant Science**, v. 168, p. 1615–1623, 2005.
- ANDREOU, A.; FEUSSNER, I. Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism. **Phytochemistry**, v. 70, p.1504-1510, 2009.
- BAUD, S.; LEPINIEC, L. Physiological and developmental regulation of seed oil production. **Progress in Lipid Research**, v. 9, 235–249, 2010.
- BEHROUZIAN, B.; FAUCONNOT, L.; DALIGAULT, F.; NUGIER-CHAUVIN, C.; PATIN, H.; BUIST, P. H. Mechanism of fatty acid desaturation in the green alga *Chlorella vulgaris*. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 3545–3549, 2001.
- BILYEU, K. D.; PALAVALLI, L.; SLEPER, D. A.; BEUSELINCK, P. R. Three microsomal omega-3 fatty-acid desaturase genes contribute. **Crop Science**, v. 43, p.1833–1838, 2003.
- BILYEU, K. D.; PALAVALLI, L.; SLEPER, D. A.; BEUSELINCK, P. R. Molecular genetic resources for development of 1% linolenic acid soybeans. **Crop Science**, v. 46, p.1913–1918, 2006.
- BUIST, P. H.; BEHROUZIAN, B. Deciphering the cryptoregiochemistry of oleate Δ -12-desaturase: A kinetic isotope effect study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, p. 871–876, 1998.

- BYFIELD, G. E.; UPCHURCH, R. G. Effect of temperature on delta-9 stearoyl-acyl-CoA and microsomal omega-6 desaturase gene expression and fatty acid content in developing soybean seeds. **Crop Science**, v. 47, p. 1698-1704, 2007.
- CHAPPELL, A. S.; BILYEY, K. D. The low linolenic acid soybean line PI 361088b contains a novel gmFAD3A mutation. **Crop Science**, v. 47, p. 1705-1710, 2007.
- COROL. Disponível em <<http://www.corol.com.br/curi2.htm>> Acessado em 20 de abril de 2012.
- COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F. The utilization of used frying oil for the production of biodiesel. **Química Nova**, v. 23, p. 531-537, 2000.
- CREGAN, P. B.; BHAGWAT, A. A.; AKKAYA, M. S.; JIANG, R. Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. **Methods Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 49-61, 1994.
- DORFMAN, S. E.; LAURENT, D.; GOUNARIDES, J. S.; LI, X.; MULLARKEY, T. L.; ROCHEFORD, E. C.; SARI-SARRAF, F.; HIRSCH, E. A.; HUGHES, T. E.; COMMERTON, S. R. Metabolic implications of dietary trans-fatty acids. **Obesity**, v.17, p. 1200-1207, 2009.
- DYER, J. M.; CHAPITAL, D. C.; KUAN, J. W.; MULLEN, R. T.; TURNER, C.; MCKEON, T. A.; PEPPERMAN, A. B. Molecular analysis of a bifunctional fatty acid conjugase/desaturase from tung. Implications for the evolution of plant fatty acid diversity. **Plant Physiology**, v. 130, p. 2027-2038, 2002.
- FARHOOSH, R.; EINAFAHAR, S.; SHARAYEI, P. The effect of commercial refining steps on the rancidity measures of soybean and canola oils. **Food Chemistry**, v. 115, p. 933-938, 2009.
- FATEMI, S. H.; HAMMOND, E. G. Glyceride structure variation in soybean varieties: I. Stereospecific analysis. **Lipids**, v.12, p.1032-1036, 1977.
- FEHR, W. R. Breeding for Modified Fatty Acid Composition in Soybean. **Crop Science**, v. 47, p. S-72-87S, 2007
- GERDE, J.; HARDY, C.; FEHR, W.; WHITE, P. J. Frying Performance of No-trans, Low-Linolenic Acid Soybean Oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 557-563, 2007.

- HARWOOD, J. L. Plant Lipid metabolism. **Plant Biochemistry**, p. 237-272, 1997.
- HEPPARD, E. P.; KINNEY, A. J.; STECCA, K. L.; MIAO, G. H. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal ω -6-desaturase genes in soybeans. **Journal Plant Physiology**, v. 110, p. 311-319, 1996.
- HIROMOTO, D. M.; VELLO, N. A. The genetic base of Brazilian soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars. **Revista Brasileira de Genética**, v. 9, p. 295-306, 1986.
- ICEX. Disponível em <<http://www.icexindia.com/Home.aspx>>, acessado em 24 de abril de 2012.
- IZQUIERDO, N. G.; AGUIRREZÁBAL, L.A.N. ; ANDRADE, F.H.; GEROUDET, C.; VALENTINUZ, O.; PEREYRA IRAOLA, M. Intercepted solar radiation affects oil fatty acid composition in crop species. **Field Crops Research**, v. 114, p. 66–74, 2009.
- KNOTHE, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Processing Technology**, v. 88, p. 669-677, 2007.
- LEE, J. D. ; BILYEU, K. D.; SHANNON, J. G. Genetics and breeding for modified fatty acid profile in soybean seed oil. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 10, p. 201-210, 2007.
- LI, L.; WANG, X.; GAI, J.; YU, D. Molecular cloning and characterization of a novel microsomal oleate desaturase gene from soybean. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1516-1526, 2007.
- LIAVONCHANKA, A.; FEUSSNER, I. Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p. 348-357, 2006.
- MILLAR, A. A.; SMITH, M. A.; KUNST, L. All fatty acids are not equal: discrimination in plant membrane lipids. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 95-101, 2000.
- NOGUEIRA, L. A. H. Does biodiesel make sense? **Energy**, in press, 2010.
- OHLROGGE, J.; BROWSEB, J. Lipid biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 957-970, 1995.
- OLIVA, M. L.; SHANNON, J. G.; SLEPER, D. A.; ELLERSIECK, M. R.; CARDINAL, A. J.; PARIS, R. L.; LEE, J. D. Stability of fatty acid profile in

- soybean genotypes with modified seed oil composition. **Crop Science**, v. 46, p. 2069–2075, 2006.
- PINTO, M. O. **Regulação da biossíntese de ácidos graxos insaturados durante a ontogenia de sementes de soja**. Tese MS, UFV, Viçosa, MG, 76p. 2008.
- PORTAL DO BIODIESEL. Disponível em <<http://www.biodieselbr.com/>>, acessado em 20 de abril de 2012.
- RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, A. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 261–268, 2009.
- ROBINSON, D. S.; WU, Z.; DOMONEYB, C.; CASEY, R. Lipoxygenases and the quality of foods. **Food Chemistry**, v. 54 p. 33-43, 1995.
- SCHLUETER, J. A.; VASYLENKO-SANDERS, I. F.; DESHPANDE, S.; YI, J.; SIEGFRIED, M.; ROE, B. A.; SCHLUETER, S. D.; SCHEFFLER, B. E.; SHOEMAKER, R. C. The FAD2 Gene Family of Soybean: Insights into the Structural and Functional Divergence of a Paleopolyploid. **Genome The Plant Genome** [A Supplement to Crop Science], n° 1, January 2007.
- SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? **Química Nova**, v. 24, p. 247-251, 2001.
- SHANKLIN, J.; CAHOON, E. B. Desaturation and related modifications of fatty acids. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 611–641, 1998.
- SOYSTATS. Disponível em <<http://www.soystats.com/2008/Default-frames.htm>>, acessado em 20 de abril de 2012.
- TANG, G. Q.; NOVITZKY, W. P.; GRIFFIN, H. C.; HUBER, S. C.; DEWEY, R. E. Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation. **The Plant Journal**, v. 44, p. 433–446, 2005.
- VAN DE LOO, F. J.; BROUN, P.; TURNER, S.; SOMERVILLE, C. An oleate 12-hydroxylase from *Ricinus communis* L. is a fatty acyl desaturase homolog. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 92, p. 6743–6747, 1995.

YADAV, N. S. Genetic modification of soybean oil quality. In: Verma, D. P. S.; SHOEMAKER, R. C. (Eds.). Soybean genetics, molecular biology and biotechnology. USA: CAB INTERNATIONAL, WALLINGFORD, CT, p. 127-188, 1996.

WADUMESTHRIGE, K.; SALLEY, S. O.; SIMON K.Y. Effects of partial hydrogenation, epoxidation, and hydroxylation on the fuel properties of fatty acid methyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 90, p. 1292–1299, 2009

WALLIS, J. G.; WATTS, J. L.; BROWSE J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, p. 467-473, 2002.

**Capítulo I – Acúmulo de transcritos dos genes das ω -6 e ω -3
dessaturases de ácidos graxos em sementes de soja cultivadas em
diferentes temperaturas**

1 Resumo

Fatores ambientais, como a temperatura de cultivo, podem provocar alterações no conteúdo de ácidos graxos na fração óleo de sementes de soja. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura na composição de ácidos graxos, no conteúdo de óleo e na expressão dos genes que codificam as ω -6 e ω -3 dessaturases em soja. Para isso, foram utilizados os genótipos: CD219, variedade comercial com concentrações normais de ácido oléico (~19%) e ácido linolênico (~8%); A29, com baixa concentração de ácido linolênico (~1%) e FA22, com elevada concentração de ácido oléico (~50%). O experimento foi conduzido em duas casas de vegetação: i) com aquecimento, com temperaturas médias na faixa de 32/27°C; ii) sem aquecimento, com temperaturas médias na faixa de 26/14°C. Sementes em desenvolvimento foram subdivididas em dez estádios de acordo com o seu peso úmido. O conteúdo de óleo foi determinado no extrator *soxhlet* e o conteúdo de ácidos graxos por cromatografia gasosa. Os possíveis genes das dessaturases foram identificados no banco de dados *Phytozome* e a partir dessas sequências foram desenhados *primers* para experimentos de expressão gênica nos 5° e 8° estádios de desenvolvimento. Não foi observado efeito significativo da temperatura de cultivo no teor de óleo bruto em sementes maduras dos genótipos CD219, A29 e FA22. O genótipo FA22 apresentou maior conteúdo de ácido oleico e menor conteúdo de ácido linolênico em sementes cultivadas em alta temperatura em todos os estádios de desenvolvimento. Enquanto que em CD219 esse efeito foi observado apenas nos estádios finais. Quinze genes foram identificados como potenciais constituintes da família das dessaturases: oito para as ω -6-dessaturases e sete para as ω -3-dessaturases. Os genes Glyma10g42470 e Glyma20g24530 (ω -6-dessaturases) e Glyma02g39230, Glyma14g37350 e Glyma18g06950 (ω -3-dessaturases) apresentaram os maiores valores de expressão relativa. Contrariamente ao esperado, os genes das ω -6-dessaturases Glyma10g42470, Glyma15g23200, Glyma19g32940 e Glyma20g24530 apresentaram maior acúmulo de transcritos na maior temperatura (32/27°C) de cultivo nas sementes em desenvolvimento. O gene da ω -3-dessaturase Glyma18g06950 apresentou perfil de expressão condizente com as alterações no conteúdo de ácido linoléico/linolênico nos genótipos FA22 e CD219 em função da temperatura em sementes de soja em desenvolvimento.

2 Introdução

A semente de soja é constituída basicamente de proteínas (40%), carboidratos (30%) e óleo (20%). Os triacilgliceróis (TAG), moléculas compostas do glicerol esterificado a três ácidos graxos, representam a classe de lipídeos mais abundante nas sementes dessa leguminosa. Os principais ácidos graxos constituintes dos TAG são o ácido palmítico (16:0) - 10%, ácido esteárico (18:0) - 3%, ácido oléico (18:1 Δ^9) - 20%, ácido linoléico (18:2 $\Delta^{9,12}$) - 57% e ácido linolênico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$) - 10%; podendo ser encontrados mutantes de soja com teores de ácidos graxos alterados (Lee *et al.*, 2007; Fehr, 2007).

A estabilidade oxidativa do óleo e de seus subprodutos é afetada diretamente pela composição de ácidos graxos nas moléculas dos TAG. Óleos de soja com elevados teores de ácidos graxos polinsaturados – linoléico e linolênico – são mais suscetíveis às hidroperoxidações resultando em cetonas e aldeídos voláteis que alteram a sua qualidade e sabor (Costa Neto *et al.*, 2000; Farhoosh *et al.*, 2009). Além disso, a utilização de óleos de soja como alto teor de ácidos graxos insaturados para a produção de biodiesel leva à produção de um combustível com qualidade inferior, com baixo índice de cetano e maior instabilidade oxidativa (Knothe, 2007; Ramos, 2009 *et al.*).

O conteúdo de óleo e a composição de ácidos graxos nas sementes de soja são fortemente influenciados por fatores ambientais. Dentre eles, destaca-se a temperatura durante o desenvolvimento da semente. Em soja, foi observado que o aumento da temperatura resulta na redução dos conteúdos de ácido linoléico e linolênico, e um significativo aumento no conteúdo do ácido oléico (Lanna, 2002; Wilson, 2004; Oliva *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2009).

O estudo da regulação das vias de biossíntese de ácidos graxos pode fornecer um maior entendimento dos mecanismos pelos quais os fatores genéticos, ambientais e a interação entre eles afetam essa via biossintética. A partir desse estudo, pode-se direcionar o processo de produção de genótipos superiores com conteúdos de ácidos graxos mais adequados para diversos fins.

A via de biossíntese de ácidos graxos polinsaturados em sementes de soja envolve as enzimas dessaturases, principalmente as do retículo endoplasmático (microsossomais). Os principais substratos para essas enzimas são os resíduos de ácidos graxos ligados à

fosfatidil colina (PC). A ω -6-dessaturase converte oleil em linoleil, enquanto a ω -3-dessaturase é responsável pela conversão de linoleil em linolenil (Baud & Lepiniec, 2010; Yadav, 1996).

Alguns genes já foram caracterizados como sendo responsáveis pela produção das dessaturases de soja. Os estudos indicam que os principais genes responsáveis pela biossíntese de ácidos graxos polinsaturados de reserva são o GmFAD3A, que codifica uma ω -3-dessaturase (Bilyeu *et al.*, 2003), e o FAD2-1, que codifica uma ω -6-dessaturase (Heppard *et al.*, 1996). No entanto, o número exato de genes que controla a via de biossíntese de ácidos graxos insaturados ainda não é conhecido e os seus efeitos individuais, aditivos e as possíveis interações não estão bem caracterizados.

O Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja (PMQS) do BIOAGRO/UFV dispõe de diferentes linhagens mutantes de soja com alterações na composição de ácidos graxos da semente. Entre eles destacam-se a linhagem FA22, que possui teor médio a elevado de ácido oléico, em torno de 50%, e a linhagem A29, que possui um baixíssimo teor de ácido linolênico, em torno de 1%. Assim, para maximizar o processo de obtenção de genótipos superiores é crucial o entendimento do efeito da temperatura na composição de ácidos graxos nesses genótipos, assim como o entendimento dos possíveis meios de regulação. O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar o efeito da temperatura de cultivo na composição de ácidos graxos, no conteúdo de óleo e na expressão gênica das ω -6 e ω -3 dessaturases dos genótipos CD219, A29 e FA22.

3 Material e métodos

3.1 Material genético

Foram utilizados três genótipos de soja: A29, FA22 e CD219RR. O genótipo A29 (1% de ácido linolênico), desenvolvido por meio de mutagênese por pesquisadores da Universidade Estadual de Iowa (EUA). O genótipo FA22 foi selecionado em uma população de melhoramento com reduzido ácido linoléico e possui elevado conteúdo de ácido oléico, aproximadamente 50%. A variedade CD219RR (OC94.2062 x CO 2131RR) possui teores normais de ácido linolênico (~8 %) e ácido oléico (~19 %), além de apresentar resistência ao herbicida glifosato e foi desenvolvida pela empresa COODETEC (Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola).

3.2 Condições de cultivo

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa, no período de maio a agosto de 2010. O experimento foi conduzido em duas casas de vegetação: i) com aquecimento, que permitiu a obtenção de temperaturas médias diurnas de 32°C e noturnas de 27°C; ii) sem aquecimento, com temperaturas médias diurnas de 26°C e noturnas de 14°C. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 50 vasos por genótipo. As sementes foram plantadas em vasos de três litros contendo solo previamente adubado, cultivando-se três plantas por vaso.

As sementes em desenvolvimento de cada genótipo foram coletadas e congeladas separadamente em nitrogênio líquido, de acordo com o seu peso úmido:

1° estágio: 26 a 75mg;

2° estágio: 76 a 125 mg;

3° estágio: 126 a 175mg;

4 ° estágio: 176 a 225 mg;

5° estágio: 226 a 275 mg;

6° estágio: 276 a 325mg;

7° estágio: 326 a 375 mg;

8° estágio: 376 a 425mg;

9 ° estágio:426 a 475mg;

10° estágio: Semente madura.

As sementes foram mantidas a -80°C até a sua utilização nos experimentos.

3.3 Determinação da concentração de óleo total

Para a determinação do conteúdo de óleo total foram utilizadas apenas as sementes fisiologicamente maduras. A determinação foi realizada em aparelho extrator de *Soxhlet*, utilizando-se éter de petróleo como solvente, segundo o procedimento descrito em Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (Instituto Adolfo Lutz, 1985), com refluxo por 10 horas. Foram feitas três extrações individuais e independentes para cada amostra, sendo todas as análises realizadas em duplicata.

3.4 Determinação das concentrações dos ácidos graxos

As concentrações dos ácidos graxos na fração óleo das sementes nos estádios de desenvolvimento foram determinadas por cromatografia gasosa. Para compor cada amostra foram tomadas ao acaso de 7 a 10 sementes de cada estágio de desenvolvimento/genótipo. No preparo da amostra, as sementes foram pulverizadas, na presença de nitrogênio líquido, em gral e pistilo. A extração dos ácidos graxos e sua derivatização a metil-ésteres foram realizadas seguindo metodologia descrita por Jham *et al.* (1982). Foram feitas três extrações individuais e independentes para cada amostra, sendo as análises realizadas em duplicata.

3.4.1 Expressão gênica das ω -6 e ω -3 dessaturases

3.4.1.1 Extração e purificação de RNA

A extração de RNA total de sementes de soja foi realizada com o reagente Trizol[®] (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. As extrações foram realizadas em amostras de 100 mg dos genótipos FA22 e CD219, no 5° e 8° estádios, constituindo de três extrações individuais e independentes. Para compor cada amostra

foram tomadas ao acaso 9 sementes de cada estágio de desenvolvimento/genótipo. Após a extração de RNA das amostras, foi determinada a sua concentração em espectrofotômetro a 260 nm. A qualidade do RNA foi avaliada pela integridade das bandas do RNA ribossômico em gel de agarose 1,5%. A pureza foi determinada pela razão das absorbâncias nos comprimentos de onda a 230 nm, 260 nm e 280 nm. Por fim, o RNA total foi tratado com DNase RNase Free (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram novamente quantificadas e avaliadas quanto à integridade, como descrito anteriormente.

3.4.2 Síntese de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 1 µg do RNA total, utilizando a M-MLV Reverse Transcriptase (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a síntese de cDNA, foram realizadas reações de amplificação controle para a verificação de possível contaminação com DNA genômico, utilizando *primers* que flanqueiam um íntron do gene de actina, permitindo assim diferenciar o produto gênico amplificado a partir de RNA ou DNA. Os *primers* utilizados para as reações controle foram: Forward 5' CCC CTC AAC CCA AAG GTC AAC AG 3' e Reverse 5' GGA ATC TCT CTG CCC CAA TTG TG 3'. Cada reação de amplificação de 25 µL foi constituída de 25 ng de cDNA; Tris-HCl 10 mM pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; 0,2 mM de cada um dos desoxirribose nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 0,8 µM de *primers* e 1 U de Taq DNA polimerase. Os ciclos de amplificação da reação de PCR foram constituídos por uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos constituídos por: uma segunda etapa de desnaturação a 94 °C por 1 min, uma etapa de ligação dos *primers* ao cDNA molde a 56 °C por 1 min e 30 s e uma etapa de extensão a 72 °C por 2 min. Após o 35º ciclo foi realizado um passo final de extensão a 72 °C por 7 min. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM) contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo, e visualizados em transiluminador e fotodocumentado.

3.4.3 Identificação e caracterização *in silico* dos genes das ω -6 e ω -3 dessaturases

3.4.3.1 Obtenção das sequências

A identificação *in silico* dos membros da família gênica das ω -3-dessaturases e ω -6-dessaturases de soja foi realizada por meio da pesquisa utilizando palavras-chaves apropriadas e de *Blast* das seqüências dessas dessaturases disponíveis no GeneBank contra o genoma da soja disponível no banco de dados *Phytozome* (<http://www.phytozome.net/>). As seqüências disponíveis no GeneBank utilizadas para a realização do *Blast* estão identificadas na Tabela 1.

Tabela 1: Identificação e tamanho dos genes disponíveis no GeneBank (NCBI) utilizados para o *Blast* contra o genoma da soja contido no banco de dados *Phytozome*.

Gene	ID NCBI	Nº de nucleotídeos CDS
<i>FAD2-1</i>	L43920	1164
<i>FAD2-2</i>	L43921	1152
<i>GmFAD3A</i>	AY204710	1131
<i>GmFAD3B</i>	AY204711	1143
<i>GmFAD3C</i>	AY204712	1143

As seqüências identificadas foram caracterizadas pela presença do domínio conservado das dessaturases no site Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/family?entry=PF00487>). Apenas as seqüências que continham os três *boxes* característicos das ω -3 e ω -6 dessaturases foram consideradas para análises subseqüentes.

3.4.3.2 Análise de expressão *in silico*

Para uma avaliação inicial da expressão dos genes que codificam as dessaturases, foram utilizadas buscas, por meio de *blastn*, no banco de ESTs de soja do NCBI por meio do *SoyBase* (<http://soybase.org/GlycineBlastPages/>), constituído de 394.070 seqüências. O ponto de corte utilizado foi um e-value = $1e^{-100}$. Foi avaliada também a expressão gênica utilizando o atlas de RNA-Seq do *Soybase* (<http://soybase.org/soyseq/index.php>).

3.4.4 Análise do acúmulo de transcritos das ω -6 e ω -3 dessaturases

A análise dos níveis de transcritos foi realizada utilizando-se a metodologia de PCR quantitativo. *Primers* específicos foram desenhados a partir das seqüências de nucleotídeos dos cDNAs completos correspondentes aos genes que codificam as principais ω -6-dessaturases e ω -3-dessaturases de ácidos graxos de soja e para quatro genes endógenos (ACT11, UNK1, UNK2 e CONS7) previamente descritos na literatura (Libault *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2009) (Tabela 2).

Tabela 2: Conjunto de *primers* utilizados no experimento de qPCR

Gene	Primer F	Primer R
ω-6-dessaturases		
Glyma02g36460	CTCTGGCCTTTATGCCTCTGA	TGCCAAGCAGTATCTTCACG
Glyma03g30070	GCGGGTGGCCGAAGTGA	TGAAAACAGTGAGGTGGAATGA
Glyma09g17170	GGCCTAATCCTCCACTCACT	GTTCGAGTGATCCTGTGTTC
Glyma10g42470	GGCCAAAGTGGAAGTTCAAGG	GGAGCGCTGAAAGCAGTGT
Glyma15g23200	GAAGGCCTTATGATAGATTTGCTTA	CTGCAAGAATGTAATCAACACCG
Glyma19g32930	TCTGTTCTGCGCTCATTCTCA	CAGCTAGGGTGAATCCTTGC
Glyma19g32940	CCAAAGCAGAAGTCCAGTATCAT	CAAGCGTGAGGGTGACGG
Glyma20g24530	CAAGGTTGCATTCTTACTGGC	TGAGTGAACGGTCAAACCCAT
ω-3-dessaturases		
Glyma01g29630	AAGACCCATTTTCGTGCCAAAAG	CCCTCAGTGGTGGCAACC
Glyma02g39230	CTGCCAATAATGGATACCAACAAA	TCTTAAACGGTGGAGGAGCG
Glyma03g07570	CTCTCCACCAGTGTTCAC	ACAGCATGTTAACCTCTTGC
Glyma07g18350	GTGTGATGTAATCAATGGGAG	AATGACATCCCTACCACATAG
Glyma11g27190	TCTGAGGGATGTGTTGATAGTTT	AAGAGCCAGCTATTGAAGCCA
Glyma14g37350	GCTGCTAATAATGGATACCAAAAAG	AAACGGTGGAGGAGCACT
Glyma18g06950	TGAGGGATGTGTTGGTAGTGA	AAGAACCAGCTATTGAAGCCG
Endógenos		
ACT11	ATCTTGACTGAGCGTGGTTATTCC	GCTGGTCCTGGCTGTCTCC
UNK1	TGGTGCTGCCGCTATTTACTG	GGTGAAGGAAGTCTAACAATC
UNK2	GCCTCTGGATACCTGCTCAAG	ACCTCCTCCTCAAACCTCCTCTG
CONS7	ATGAATGACGGTTCATGTA	GCATTAAGGCAGCTCACTCT

As reações de qPCR foram realizadas utilizando o termociclador SDS ABI PRISM[®] 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As amostras foram analisadas em duplicata, em reações de 20 μ L contendo 50ng de cDNA, 10,0 μ L de 2X SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems) e *primers* nas concentrações de 400 nM. As condições de amplificação foram: uma etapa a 50 °C por 2 min, seguida de uma etapa de 95 °C por 10 min e 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 s e

anelamento e extensão a 60 °C durante 30 s. A curva de dissociação foi realizada após a amplificação para verificar se apenas um único amplicon era gerado em cada reação.

A estabilidade da expressão dos genes endógenos (ACT11, UNK1, UNK2 e CONS 7), nos genótipos FA22 e CD219, nas duas condições de cultivo, foi determinada por meio do programa estatístico *BestKeeper* (Pfaffl *et al.*, 2004). Esse programa utiliza os dados de eficiência de amplificação e a média do *Cycle Threshold* (Ct) dos genes analisados em todas as condições testadas. A análise pelo programa *BestKeeper* baseia-se no coeficiente de variação do número Ct (CV [% Ct]) e no desvio padrão das médias do número Ct para estimar a estabilidade de expressão dos genes analisados. Além disso, o programa cria um coeficiente de correlação, simbolizado por “r”, entre cada gene analisado e a média geométrica do valor de Ct de todos os genes candidatos juntos. Desta forma, quanto maior o coeficiente de correlação (r), maior a estabilidade de expressão do gene.

A quantificação relativa da expressão dos genes foi realizada pelo método do $2^{-\Delta Ct}$, uma modificação do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak & Schmittgen (2001), em que não se utiliza a amostra calibradora para a realização dos cálculos. Os dados de expressão gênica das réplicas biológicas foram normalizados seguindo a metodologia descrita por Willems *et al.* (2008). Os dados sofreram uma série de correções sequenciais, incluindo a transformação logarítmica, centragem na média e *autoscaling* (ajuste da quantificação em função do desvio padrão).

3.5 Análise estatística

Para a realização das análises estatísticas empregou-se o programa GENES (Cruz, 1997). As médias foram comparadas pelo teste t a 5% de probabilidade.

4 Resultados e discussão

4.1 Conteúdo de óleo

Os genótipos de soja CD219, A29 e FA22 cultivados em duas casas de vegetação com temperaturas na faixa de 32/27°C e 26/14°C não apresentaram diferenças significativas quanto ao teor de óleo das sementes (Figura 1).

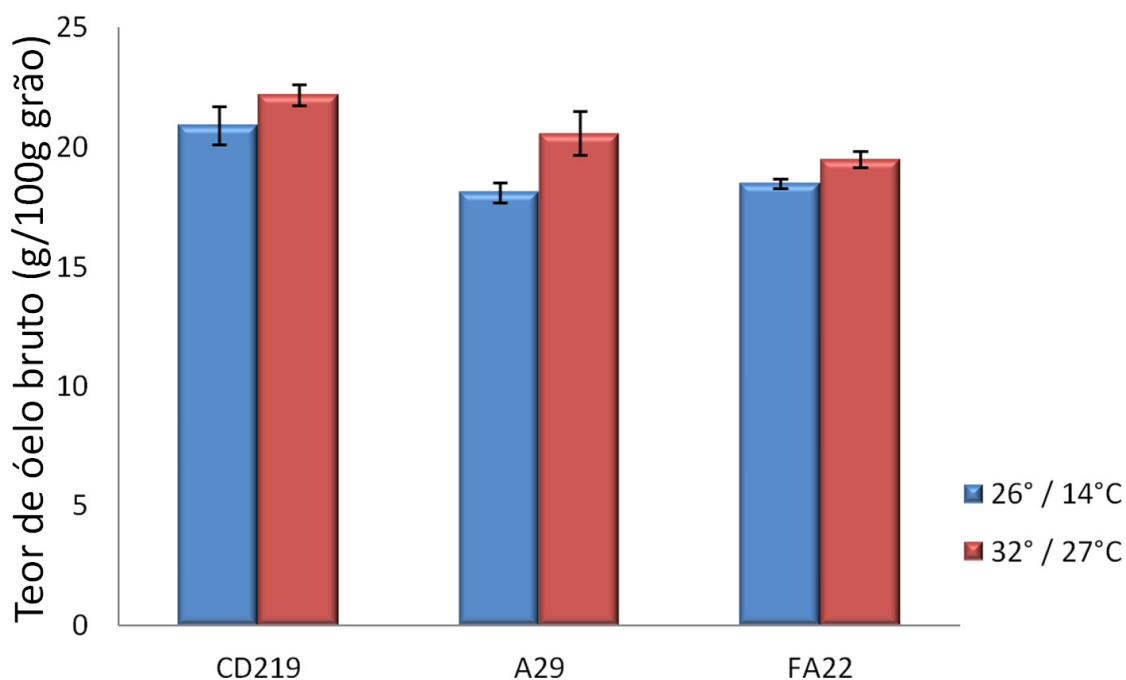


Figura 1: Teor de óleo bruto em sementes de soja maduras em genótipos contrastantes para os teores de ácido oléico e linolênico cultivados sob diferentes temperaturas. As barras representam o erro padrão da média.

Em geral, tem sido relatado que as sementes de soja desenvolvidas sob temperaturas mais altas apresentam aumento do teor de óleo bruto (Wilson, 2004). No entanto, aparentemente esse tipo de resposta é cultivar-dependente. Thomas *et al.* (2003) relataram que o genótipo Bragg apresentou aumento no teor de óleo bruto nas sementes de soja cultivadas a 32/22°C, comparadas com o controle cultivado a 28/18°C. Em conformidade, Ren *et al.* (2009) verificaram o aumento do teor de óleo bruto nas sementes do genótipo N98-4445A cultivadas a 37/30°C, quando comparadas com o controle a 27/18°C. No entanto, Lanna (2002) verificou que os genótipos CAC-1 e CC4 apresentaram teor de óleo bruto menor nas plantas cultivadas em altas temperaturas (38/28°C), quando comparadas com o controle cultivado a 22/13°C.

4.2 Conteúdo de ácidos graxos insaturados

De maneira geral, sementes maduras dos três genótipos apresentaram as mesmas tendências quanto ao acúmulo dos principais ácidos graxos insaturados nas duas condições de cultivo: maior acúmulo de ácido oléico em plantas cultivadas a 32/27°C (Figura 2A) e menor conteúdo de ácido linoléico e linolênico a 32/27°C (Figura 2B e 2C). No entanto, a magnitude da resposta à temperatura foi dependente do genótipo avaliado. Os genótipos CD219 e FA22 apresentaram diferenças significativas a 5% de probabilidade, nas duas condições de cultivo, para os três ácidos graxos insaturados. Porém, em A29 o efeito foi observado apenas para o ácido linolênico.

Esses resultados corroboram a observação de que o aumento da temperatura de cultivo nas sementes de soja pode alterar as concentrações dos ácidos graxos insaturados, dependendo do genótipo avaliado (Lanna, 2002; Wilson, 2004; Oliva *et al.*, 2006; Byfield & Upchurch, 2007; Ren *et al.*, 2009).

Como o genótipo A29 não apresentou diferenças estatísticas no conteúdo de ácido oléico e linoléico, e para o conteúdo de ácido linolênico os valores encontrados foram muito próximos nas duas condições de cultivo, este genótipo foi eliminado das análises posteriores. Deste modo, os estudos de análise do conteúdo de ácidos graxos durante a ontogenia da semente e de expressão gênica das dessaturases de ácidos graxos foram feitos apenas nos genótipos FA22 e CD219.

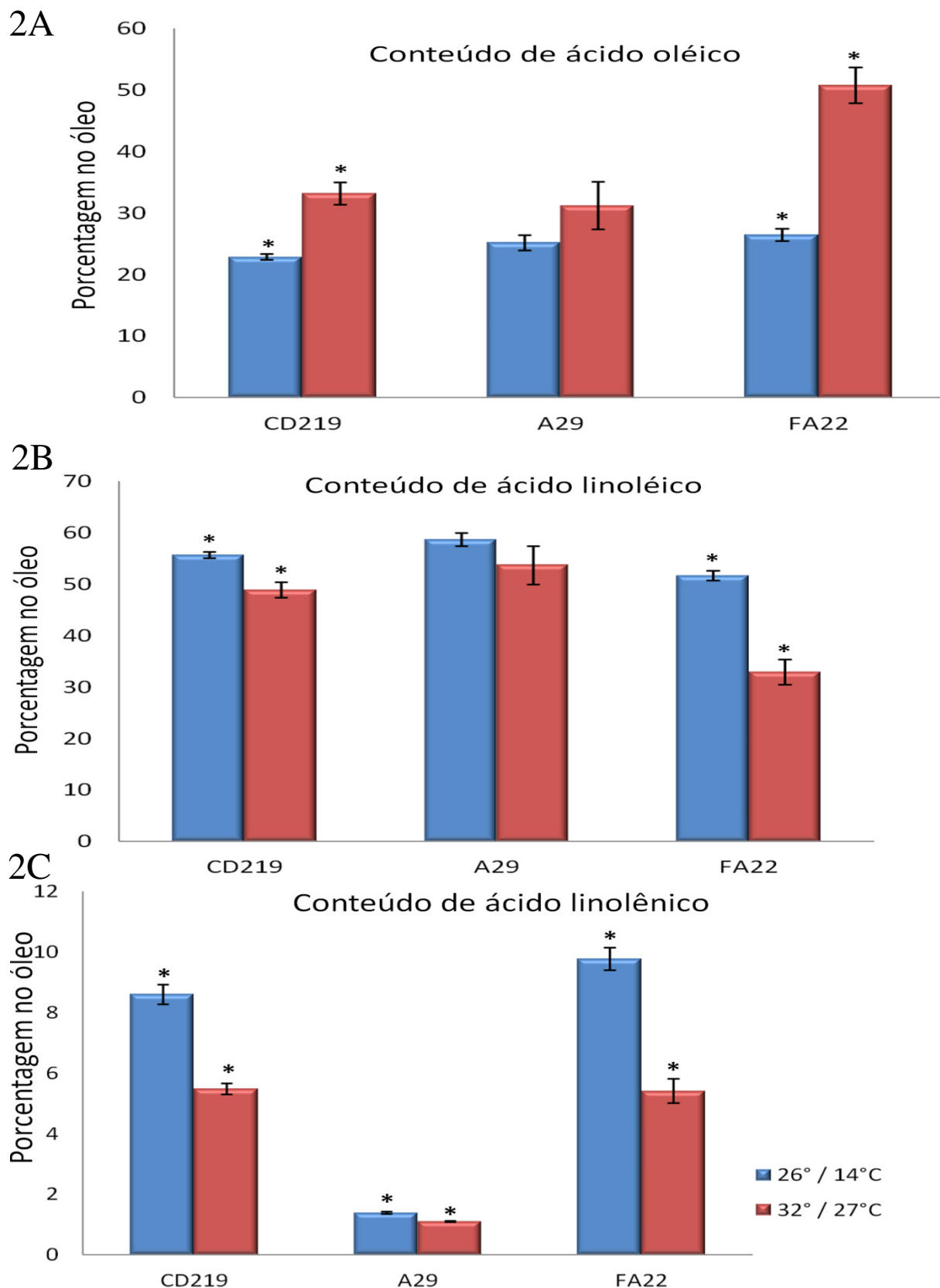


Figura 2: Conteúdos de ácidos graxos insaturados no óleo de sementes maduras de soja em genótipos contrastantes para os teores de ácido oléico e linolênico cultivados sob diferentes temperaturas. As barras representam o erro padrão da média. Médias marcadas com um asterisco dentro do mesmo genótipo diferem estatisticamente pelo teste *t* a 5% de probabilidade.

As variações do conteúdo de ácido oléico, linoléico e linolênico durante a ontogenia da semente de soja são apresentados nas Figura 3, 4 e 5. No genótipo CD219 a temperatura teve influencia diferenciada dependendo do estágio de desenvolvimento da semente: nos estádios iniciais (1° e 2° estágio) as plantas cultivadas em menor temperatura (26/14°C) apresentaram maior conteúdo de ácido oléico e nos estádios finais (7° ao 10° estágio) as plantas cultivadas em maior temperatura (32/27°C) apresentaram maior conteúdo de ácidos oléico (Figura 3A). No genótipo FA22, o conteúdo de ácido oléico foi maior nas plantas cultivadas em temperaturas elevadas, a partir dos estádios iniciais (3° estágio) (Figura 3A).

A temperatura não provocou alterações no conteúdo de ácido linoléico nos estádios iniciais e intermediários de CD219 (1°, 3°, 4° 5° e 6°) mas a partir do 7° estágio pode-se observar maior acúmulo desse ácido graxo nas plantas cultivadas em temperaturas menores (26/14°C) (Figura 4A). No genótipo FA22 essa alteração foi perceptível a partir do 5° estágio de desenvolvimento (Figura 4B).

O aumento da temperatura provocou a redução no acúmulo de ácido linolênico no genótipo CD219 a partir do 6° estágio de desenvolvimento da semente (Figura 5A). Já para o genótipo FA22 esse efeito foi observado em todos os estádios de desenvolvimento da semente avaliados (Figura 5B).

A partir desses dados, foram selecionados o 5° e 8° estádios de desenvolvimento para a realização do experimento de expressão gênica das dessaturases, com intuito de elucidar os mecanismos moleculares que levam ao maior acúmulo de ácido oléico nas sementes maduras de genótipos cultivados em altas temperaturas e ao maior acúmulo de ácido linoléico e linolênico em genótipos cultivados em baixas temperaturas.

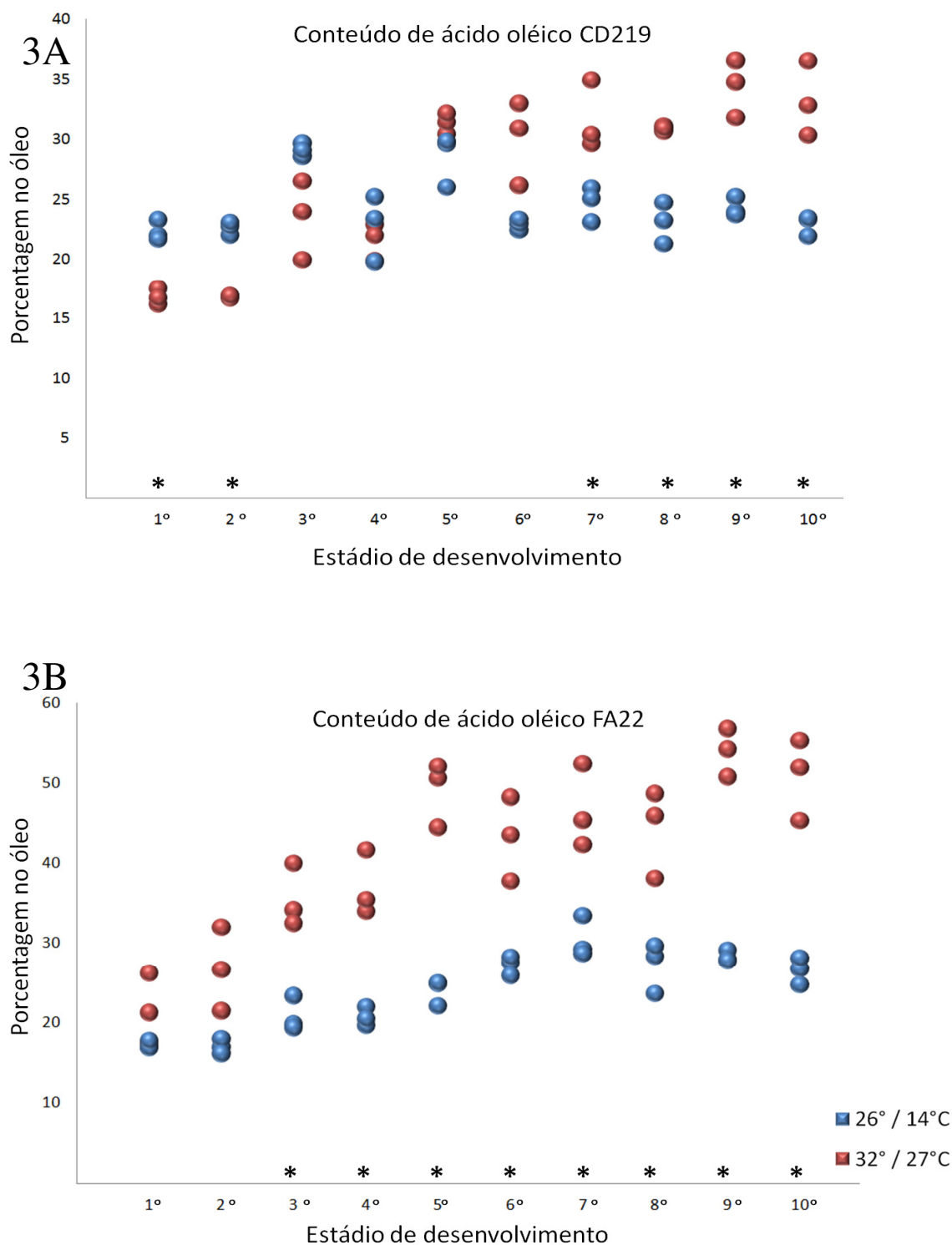


Figura 3: Conteúdo de ácido oléico no óleo durante a ontogenia de sementes de soja em genótipos contrastantes para os teores de ácido oléico cultivados sob diferentes temperaturas. 3A – CD219; 3B – FA22. Os asteriscos indicam os estádios de desenvolvimento em que a temperatura teve efeito significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.

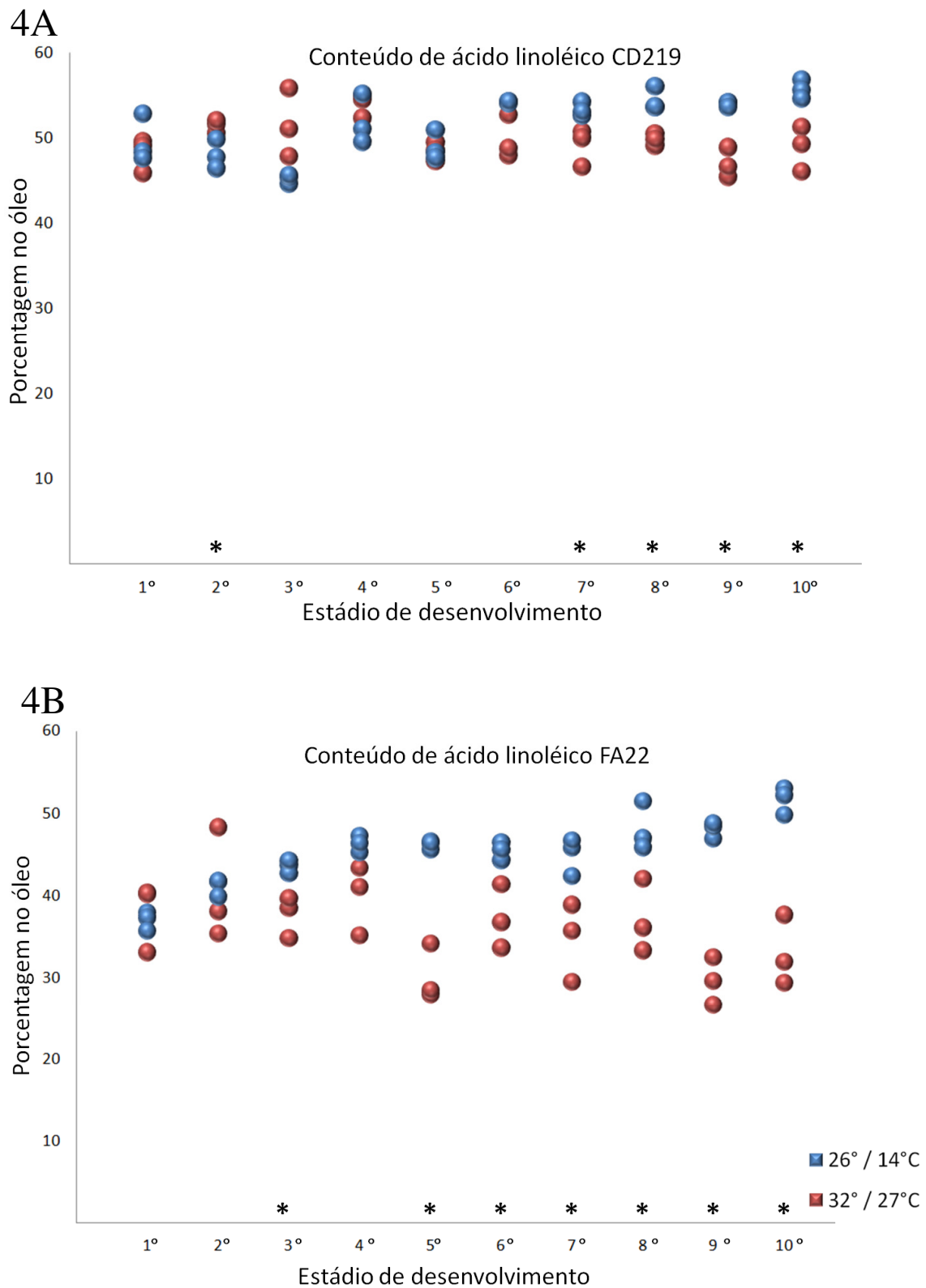
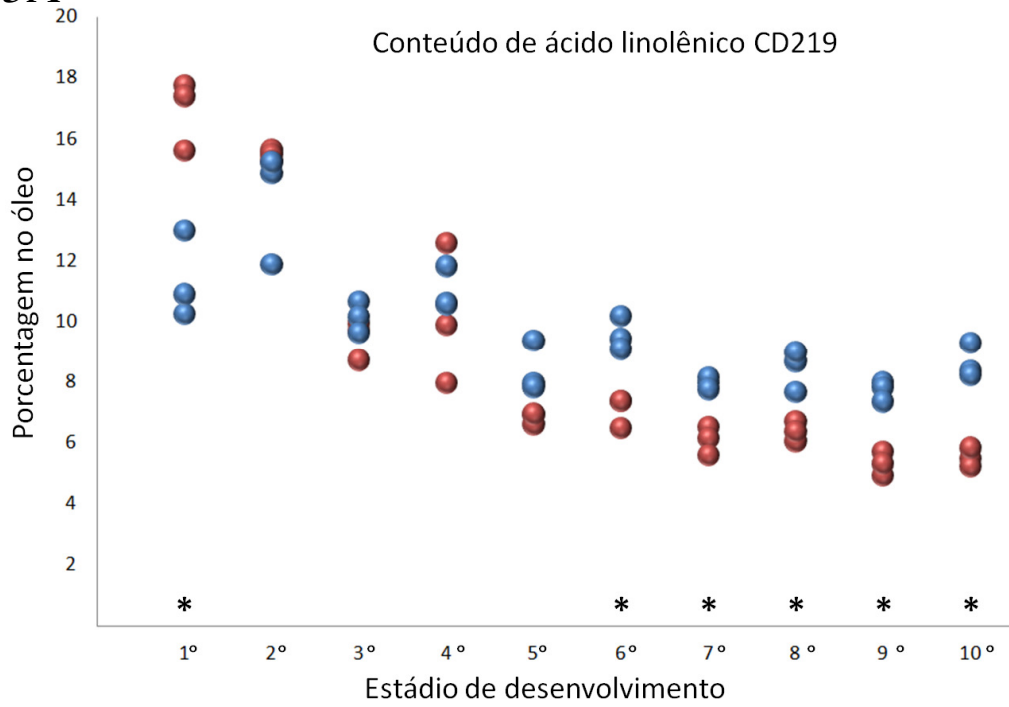


Figura 4: Conteúdo de ácido linoléico no óleo durante a ontogenia de sementes de soja em genótipos contrastantes para os teores de ácido oléico cultivados sob diferentes temperaturas. 4A – CD219; 4B – FA22. Os asteriscos indicam os estágios de desenvolvimento em que a temperatura teve efeito significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.

5A



5B

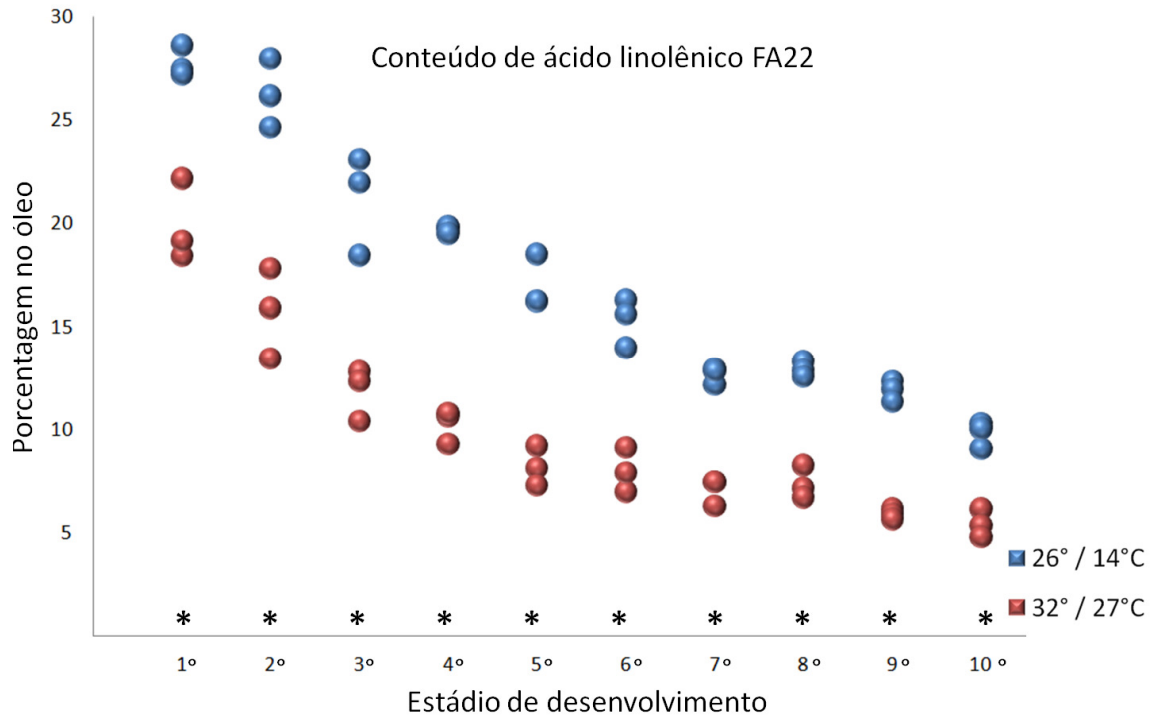


Figura 5: Conteúdo de ácido linolênico no óleo durante a ontogenia de sementes de soja em genótipos contrastantes para os teores de ácido oléico cultivados sob diferentes temperaturas. 5A – CD219; 5B – FA22. Os asteriscos indicam os estágios de desenvolvimento em que a temperatura teve efeito significativo pelo teste t a 5% de probabilidade.

4.3 Expressão gênica das ω -6 e ω -3 dessaturases

4.3.1 Obtenção das sequências

As buscas pelas sequências das dessaturases de ácidos graxos de soja no banco de dados *Phytozome* permitiu a identificação de 15 potenciais genes da família das dessaturases: Glyma01g29630; Glyma02g36460; Glyma02g39230; Glyma03g07570; Glyma03g30070; Glyma07g18350; Glyma09g17170; Glyma10g42470; Glyma11g27190; Glyma14g37350; Glyma18g06950; Glyma15g23200; Glyma19g32930; Glyma19g32940 e Glyma20g24530.

As dessaturases de ácidos graxos possuem três *boxes* de histidina que se ligam a átomos de ferro e compõem o sítio ativo da enzima. As sequências desses *boxes* foram conservadas ao longo da evolução e a partir da sua análise é possível classificar as dessaturases em diferentes subfamílias (Hashimoto *et al.*, 2008; Chi *et al.*, 2011). As sequências de aminoácidos com a identificação dos *boxes* de histidina e dos domínios trans-membrana das ω -6 e ω -3 dessaturases, respectivamente, são apresentadas nas Figuras 6 e 7.

Com base nas sequências de aminoácidos dos *boxes* de histidina foi possível diferenciar a ω -6-dessaturase cloroplastidial (Glyma02g36460) das demais do retículo endoplasmático (Glyma03g30070; Glyma09g17170; Glyma10g42470; Glyma15g23200; Glyma19g32930; Glyma19g32940; Glyma20g24530). As sequências de aminoácidos do três *boxes* de histidina da Glyma02g36460 são HDCAHR; HDRHH e HIPHH, enquanto que nas ω -6-dessaturases do retículo endoplasmático são HECGH; HRRHH e HVA/VHH (Figura 6).

O gene Glyma02g36460 é designado GmFAD6 e já foi clonado anteriormente (William *et al.*, 1994) (Tabela 3). Outros seis genes de ω -6-dessaturases já haviam sido identificados anteriormente: GmFAD2-1A (Glyma10g42470) GmFAD2-1B (Glyma20g24530); GmFAD2-2A (Glyma19g32930); GmFAD2-2B (Glyma19g32940); GmFAD2-2C (Glyma03g30070) e FAD2-3 (Heppard *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Schlueter *et al.*, 2007 e Chi *et al.*, 2011).

Tabela 3: Potenciais genes da família das ω -6-dessaturases

Gene <i>Phytozome</i>	Nome anterior	Referências
Glyma02g36460	GmFAD6	William <i>et al.</i> , 1994
Glyma03g30070	GmFAD2-2C	Schlueter <i>et al.</i> , 2007 e Chi <i>et al.</i> , 2011
Glyma09g17170		
Glyma10g42470	GmFAD2-1A	Schlueter <i>et al.</i> , 2007 e Chi <i>et al.</i> , 2011
Glyma15g23200		
Glyma19g32930	GmFAD2-2A	Schlueter <i>et al.</i> , 2007 e Chi <i>et al.</i> , 2011
Glyma19g32940	GmFAD2-2B	Schlueter <i>et al.</i> , 2007 e Chi <i>et al.</i> , 2011
Glyma20g24530	GmFAD2-1B	Schlueter <i>et al.</i> , 2007 e Chi <i>et al.</i> , 2011

Os outros 7 genes (Glyma01g29630; Glyma02g39230; Glyma03g07570; Glyma07g18350; Glyma11g27190; Glyma14g37350; Glyma18g06950) apresentaram resíduos de aminoácidos no *box* de histidina característicos de ω -3-dessaturases HDCGH; HRTTH e HVIHH. Todavia, apenas com essa análise não foi possível diferenciar qual sequencia é de retículo endoplasmático ou cloroplasto.

Alguns genes das ω -3-dessaturases já haviam sido descritos anteriormente na literatura (Tabela 4). Bilyeu *et al.* (2003) identificaram três genes de ω -3-dessaturases microsossomais: GmFAD3A (Glyma14g37350), GmFAD3B (Glyma02g39230) e GmFAD3C (Glyma18g06950). Enquanto que outros três genes foram previamente descritos como ω -3-dessaturases cloroplastidiais: GmFAD7-2 (Glyma07g18350) (Andreu *et al.*, 2010), GmFAD8-1 (Glyma01g29630) e GmFAD8-2 (Glyma03g07570) (Chi *et al.*, 2011).

Tabela 4: Potenciais genes da família das ω -3-dessaturases

Gene <i>Phytozome</i>	Nome anterior	Referências
Glyma01g29630	GmFAD8-1	Chi <i>et al.</i> , 2011
Glyma02g39230	GmFAD3B	Bilyeu <i>et al.</i> , 2003
Glyma03g07570	GmFAD8-2	Chi <i>et al.</i> , 2011
Glyma07g18350	GmFAD7-2	Chi <i>et al.</i> , 2011
Glyma11g27190		
Glyma14g37350	GmFAD3A	Bilyeu <i>et al.</i> , 2003
Glyma18g06950	GmFAD3C	Bilyeu <i>et al.</i> , 2003

Andreu *et al.* (2010) descreveram a existência de um quarto gene responsável pela biossíntese de ω -3-dessaturases cloroplastidial denominado GmFAD7-1 (Glyma18g43210). No entanto, pela análise das sequencias de aminoácidos não foi possível identificar os três *box* de histidina característicos das dessaturases o que indica que essa enzima não seja funcional, dessa forma optou-se pela não inclusão desse gene nas análises posteriores.

#Glyma02g36460	MACTLADSL	LFKGSYQKPV	LRRDIAARYS	PGIFSLNSNG	LIQKRFRQR	NFVTRNKVT
#Glyma03g30070	-----	-----	-----	-----MGAGG	RTDVPPANRK	SEVDP--LKR
#Glyma09g17170	-----	-----	-----	-----MGGGG	RSSATLKHQN	SIKNHKKKR
#Glyma10g42470	-----	-----	-----MGL	AKETTMGGRG	RVAKVEVQK	KP----LSR
#Glyma15g23200	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#Glyma19g32940	-----	-----	-----	-----MGAGG	RTAVPPANRK	SEADP--LKR
#Glyma19g32930	-----	-----	-----	-----MGDT-	-----	-----MKR
#Glyma20g24530	-----	-----	-----MGL	AKETIMGGGG	RVAKVEIQK	KP----LSR
#Glyma02g36460	IHAVAIQVQ	APVESAEYRK	QLAEDYGRQ	VGEPLPDDVT	LKDVINSLPK	EVFEIDVKA
#Glyma03g30070	VPFEKPPFS-	-----	-----LSQ	IKKVIPPHCF	QRSVFRSFSY	VVYDLT----
#Glyma09g17170	VPHAKPPFT-	-----	-----LSQ	LKKAISPHCF	HRSTFRSFSY	VLYDLT----
#Glyma10g42470	VPNTKPPFT-	-----	-----VGQ	LKKAIPPHCF	QRSLLTSFSY	VVYDLS----
#Glyma15g23200	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#Glyma19g32940	VPFEKPPFS-	-----	-----LSQ	IKKAIPPHCF	QRSVLRFSY	VVYDLT----
#Glyma19g32930	VPIEKPPFT-	-----	-----LSQ	IKKAIPPHCF	QRSVLRFSY	LIYDLT----
#Glyma20g24530	VPNTKPPFT-	-----	-----VGQ	LKKAIPPHCF	QRSLLTSLSY	VVYDLS----
#Glyma02g36460	WKSVLISVTS	YALGLFMISK	APWYLLPLAW	VWTGTALTGF	FVIGHDCAHR	SFSSNKLVED
#Glyma03g30070	IAFCLYYVAT	HYFHLSP-	LSFLAWPIYW	AVQGCILTGV	WVIAHECGHH	AFSDYQLDD
#Glyma09g17170	IASCLFYAAV	NYIPTLPHEN	LSLLAWPIYW	FIOGSILTGV	WVIAHECGHH	AFSDHQWDD
#Glyma10g42470	FAF-IFYIAT	TYFHLQP-	FSLTAWPIYW	VLQGCILTGV	WVIAHECGHH	AFSKYQWDD
#Glyma15g23200	-----	-----	-----	AVQGCILTGV	WVIAHECGHH	AFSDYQLDD
#Glyma19g32940	IAFCLYYVAT	HYFHLPGP-	LSFVAWPIYW	AVQGCILTGV	WVIAHECGHH	AFSDYQLDD
#Glyma19g32930	IAFCLYYIAT	DYFHNLPHP-	LTFWAWPIYW	AVQGFLLAGL	WVIAHECGHH	AFRDYQLDD
#Glyma20g24530	LAF-IFYIAT	TYFHLPHP-	FSLTAWPIYW	VLQGCILTGV	WVIAHECGHH	AFSKYPWDD
#Glyma02g36460	IVGTLAFMPL	IYPYEPWRFK	HRRHHA	AKTNM	LREDTAWHPV	WKDEFESTPL
#Glyma03g30070	IVGLVLHSG	LVPYFSWKYS	HRRHHS	NTGS	LERDEVFVVK	QKSCIKWYSK
#Glyma09g17170	LVGLLHSL	LVPYFSWKYS	HRRHHS	NTGS	LERDEVFVVK	TKSSMGWYSK
#Glyma10g42470	VVGLTLHSTL	LVPYFSWKIS	HRRHHS	NTGS	LDRDEVFVVK	PKSKVAWFSK
#Glyma15g23200	IFGLVLHSG	LVPYFSWKYS	HRRHHS	NTGS	LERDEVFVVK	QKSCIKWYSK
#Glyma19g32940	IVGLLHSA	LVPYFSWKYS	HRRHHS	NTGS	LERDEVFVVK	QKSSIMWYSK
#Glyma19g32930	NVGLVLHSA	LVPYFSWKYS	HRRHHS	NTGS	LERDEVFVVK	QKSSIKWLSK
#Glyma20g24530	VMGLTVHSA	LVPYFSWKIS	HRRHHS	NTGS	LDRDEVFVVK	PKSKVAWYTK
#Glyma02g36460	PFRCWMSIAH	WLMWHFDLKK	-----	-----FRPS	EVPRVKISLA	CVFAFIAIGW
#Glyma03g30070	TLAVTLTLGW	PLYLALNVSG	RPYDRFACHY	DPYGPYISDR	ERLQIYISDA	GVLA-VCYGL
#Glyma09g17170	TLAITLTLGW	PLYLAFNVSG	RSYERFACHY	DPYGPYISNR	ERLQIYVSDA	GILA-VCYGL
#Glyma10g42470	SLLVTLTLGW	PMYLAFNVSG	RPYDSFASHY	HPYAPIYSNR	ERLLIYVSDV	ALFS-VITYSL
#Glyma15g23200	TLAVTLTLGW	PLYLALNVSG	RPYDRFACHY	DPYGPYISDR	ERLQIYISDA	GVLA-VCYGL
#Glyma19g32940	TLAVTLTLGW	PLYLAFNVSG	RPYDRFACHY	DPYGPYISDR	ERLQIYISDA	GVLA-VCYGL
#Glyma19g32930	TLAVITLTLGW	PMYLTFNVS-	-----	-----CSKR	-----	-----ACLGG
#Glyma20g24530	SLLITLTLGW	PLYLAFNVSG	RPYDGFASHY	HPYAPIYSNR	ERLLIYVSDV	ALFS-VITYLL
#Glyma02g36460	PLIIYKTGIM	GWIKFWLMPW	LGYHFWSMSTF	TMVHHTAPHI	PFKYSEEWNA	AQAQLNGTVH
#Glyma03g30070	FRLAMAKGLA	WVVCVYGVPL	LVVNGFLVLI	TFLQHTHPAL	PHYTSSEWDW	LRGALAT-VD
#Glyma09g17170	YKAVLAKGLV	WVVCVYGVPL	LVVNGFLVLI	TFLQHTHPAV	PHYDSSEWDW	LRGALAT-VD
#Glyma10g42470	YRVATLKGLV	WLLCVYGVPL	LIVNGFLVTI	TYLQHTHPAL	PHYDSSEWDW	LKGALAT-MD
#Glyma15g23200	FRLAMAKGLA	WVVCVYGVPL	LVVNGFSLVI	TFLQHTHPAL	PHYTSSEWDW	LRGALAT-VD
#Glyma19g32940	FCLAMAKGLA	WVVCVYGVPL	LVVNGFLVLI	TFLQHTHPAL	PHYTSSEWDW	LRGALAT-VD
#Glyma19g32930	LCLWISN---	-----	-----ACGQWLV	TILQHTHAAL	PHYNFSEWDW	LRGALATVVD
#Glyma20g24530	YRVATMKGLV	WLLCVYGVPL	LIVNGFLVTI	TYLQHTHYAL	PHYDSSEWDW	LRGALAT-MD
#Glyma02g36460	CDYPKWIEIL	CHDINVTIPH	HISPRIPSYN	LRAAHKSLQE	NWQOYLNEAS	WNWRLMKTIM
#Glyma03g30070	RDYGILNKVF	HNITDTHVAH	HLFSTMPHYH	AMEATKAIKP	ILGEYY----	-----RFDETP
#Glyma09g17170	RDYGILNKVL	HNITDTHVAH	HLFSTMPHYH	AMEATKAIKP	ILGEYY----	-----HFDETP
#Glyma10g42470	RDYGILNKVF	HNITDTHVAH	HLFSTMPHYH	AMEATNAIKP	ILGEYY----	-----QFDDTP
#Glyma15g23200	RDYGILNKVF	HNITDTHVAH	HLFSTMPHYH	AMEATKAIKP	ILGEYY----	-----
#Glyma19g32940	RDYGILNKVF	HNITDTHVAH	HLFSTMPHYH	AMEATKAIKP	ILGEYY----	-----RFDGTP
#Glyma19g32930	RDYGILNKVL	HNITGTHVVH	HLFSTMPHYH	AMDATKAIKP	ILGEYY----	-----RFDETP
#Glyma20g24530	RDYGILNKVF	HNITDTHVAH	HLFSTMPHYH	ATEATNAMKP	ILGEYY----	-----RFDDTP
#Glyma02g36460	TVCHVYDKEQ	NYVAFDELAP	EDSRPITFLK	ETMPDYA	-----	-----
#Glyma03g30070	FVKAMWREAR	ECIYVEPDQS	TESKGVFWYN	NKL----	-----	-----
#Glyma09g17170	IYKAMWREAK	ECMYVEPDKG	SNGKGVYWYN	NKL----	-----	-----
#Glyma10g42470	FYKALWREAR	ECLYVEPDEG	TSEKGVYWYR	NKY----	-----	-----
#Glyma15g23200	-----	-----	-----	-----	-----	-----
#Glyma19g32940	FVKAMWREAR	ECIYVEPDQS	TQSKGVFWYN	NKL----	-----	-----
#Glyma19g32930	FVKAMWREAR	ECIYVEPD--	TENKGVFWYN	NKL----	-----	-----
#Glyma20g24530	FYKALW----	-----	-----	-----	-----	-----

Figura 6: Alinhamento das seqüências de aminoácidos das ω -6-dessaturases de soja. Os *boxes* de histidina estão destacados em vermelho e os domínios trans-membrana, em cinza.

```

#Glyma01g29630 MATWVLSECG LRSLPPVFPR PTRPISCQKP SKFRFLSINK GVADLNLQPR GFTCYNFRER
#Glyma03g07570 MATWVLSECG LRPLPPVFPR STRPISCQKP SKSRFLSTNK GVPDLNLQAR GLTCCSFRDR
#Glyma07g18350 MATWVLSECS LKPLAPVIPR PRTGAVLSST SKVGFLETNK VLEGSKFQP- --LRCNLRRR
#Glyma02g39230 -----
#Glyma11g27190 -----
#Glyma14g37350 -----
#Glyma18g06950 -----

#Glyma01g29630 KWESGVSAPL K VATTEGEEEE ---EGINGAN -GVVEEVPEF DPSAPPPFKL ADIRASIPKH
#Glyma03g07570 KWELGVSAPL KFATNEGEEEE ---ERTINGAN NGVGEEVSEF DPSAPPPFKL ADIRAAIPKH
#Glyma07g18350 NWGLKVSAPL RIASIEEEEQ KSVDDVINGSN GVEHEKLEPF DPGAPPPFNL ADIRAAIPKH
#Glyma02g39230 --MVKDTKPL AYAAN----- -----NGYQ --QKSSSDFD DPSAPPPFKI AEIRASIPKH
#Glyma11g27190 --MVQ-AQPL QHVG----- -----NGAG --KEDLAYNF DPSAPPPFKI ADIRAAIPKH
#Glyma14g37350 --MVKDTKPL AYAAN----- -----NGYQ --KEA----F DPSAPPPFKI AEIRVAIPKH
#Glyma18g06950 --MVQ-AQPL QHVG----- -----NGAG --KEDQAY-F DPSAPPPFKI ANIRAAIPKH

#Glyma01g29630 CWVKDPWKS M SYVVRDVI V FGLAVAAAYL NNWVVWPLYW AAQGTMFVAL FVLGHDCG HG
#Glyma03g07570 CWVKDPWKS M SYVVRDVI V FGLAAAAAYL NNWVVWPLYW AAQGTMFVAL FVLGHDCG HG
#Glyma07g18350 CWVKDPLKSM SYVVRDVI V FGLASAAAYL NNWLWVPLYW AAQGTMFVAL FVLGHDCG HG
#Glyma02g39230 CWVKNPWRSL SYVLRDVI V AALVAAAIHF DNWLLWLIYC PIQGTMFVAL FVLGHDCG HG
#Glyma11g27190 CWEKNTLRSL SYVLRDVI V SALVAAAI GF NSWLFWPPYW SAQGTMFVAL FVLGHDCG HG
#Glyma14g37350 CWVKNPWRSL SYVLRDVI V AALMAAAHF NNWLLWLIYW PIQGTMFVAL FVLGHDCG HG
#Glyma18g06950 CWEKNTLRSL SYVLRDVI V TALVAAAI GF NSWFFWPLYW PAQGTMFVAL FVLGHDCG HG

#Glyma01g29630 SFSNNPKLNS VAGHLLHSSI LVPYHGWRIS HRTHHQNHGH VENDESWHPL PEKIFKSLDN
#Glyma03g07570 SFSNNPKLNS VAGHLLHSSI LVPYHGWRIS HRTHHQNHGH VENDESWHPL PEKIFKSLDN
#Glyma07g18350 SFSNNPKLNS VVGHLLHSSI LVPYHGWRIS HRTHHQNHGH VENDESWHPL PEKLFRLDIT
#Glyma02g39230 SFSDSPLLNS LVGHILHSSI LVPYHGWRIS HRTHHQNHGH IEKDES WVPL TEKIYKNLDS
#Glyma11g27190 SFSNSPMLNS IVGHILHSSI LVPYHGWRIS HRTHHQNHGH VEKDES WVPL SEKVIYKNL DN
#Glyma14g37350 SFSDSPFLNS LVGHILHSSI LVPYHGWRIS HRTHHQNHGH IEKDES WVPL TEKIYKNL DN
#Glyma18g06950 SFSNSPLLNS IVGHILHSSI LVPYHGWRIS HRTHHQNHGH VEKDES WVPL TEKVIYKNL DN

#Glyma01g29630 VTRILRFTLP FPLLAYPIYL WSRSPGKTGS HFNPDSDLFV PSERKDVITS TVCWTAMAAL
#Glyma03g07570 VTRILRFTLP FPLLAYPIYL WSRSPGKTGS HFNPDSDLFV PSERKDVITS TICWTAMAAL
#Glyma07g18350 VTRMLRFTAP FPLLAYPVYL WGRSPGKTGS HFDPSDLFV PNERKDVITS TACKWAAMLGL
#Glyma02g39230 MTRLIRFTVP FPLFVYPIYL FSRSPGKEGS HFNYPYSLFP PSERKGI AIS TLCWATMFSL
#Glyma11g27190 MTRMMRFTLP FPIFAYPFYL WSRSPGKEGS HFNYPYSLFS PGERRDVITS TLCWGMIMLSL
#Glyma14g37350 MTRLVRFTVP FPLFVYPIYL FSRSPGKEGS HFNYPYSLFP PSERKGI AIS TLCWVTMFSM
#Glyma18g06950 MTRMMRFTLP FPIFAYPFYL WSRSPGKEGS HFNYPYSLFS PGERRDVITS TLCWGMIMLSV

#Glyma01g29630 LVGLGFVMGP VQLLKLYGIP YVIFVMWLDI VTYLHHHGHE DKLPWYRGE WSYL RGG LTT
#Glyma03g07570 LVGLGFVMGP VQLLKLYGIP YAIFVMWLDI VTYLHHHGHE DKLPWYRGE WSYL RGG LTT
#Glyma07g18350 LVGLGFVMGP IQLLKLYGVP YVIFVMWLDI VTYLHHHGHE GKLPWYRGE WSYL RGG LTT
#Glyma02g39230 LIYLSFITSP LLVLKLYGIP YVIFVMWLDI VTYLHHHGHE QKLPWYRGE WSYL RGG LTT
#Glyma11g27190 LLYLSLTLDL LFMFKLYGVP YLIFVWVWLDI VTYLHHHGHE QKLPWYRGE WTYL RGG LTT
#Glyma14g37350 LIYLSFITSP VLLLKLYGIP YVIFVMWLDI VTYLHHHGHE QKLPWYRGE WSYL RGG LTT
#Glyma18g06950 LLYLSLTMGF LFMFKLYGVP YLIFVWVWLDI VTYLHHHGHE QKLPWYRGE WSYL RGG LTT

#Glyma01g29630 IDR DYGWINN IHHDIGTHVI HHLFPQIPHYHLIEATEAAK PVLGLYYREP KKSSPLPIYL
#Glyma03g07570 IDR DYGWINN IHHDIGTHVI HHLFPQIPHY HLIEATEAAK PVLGQYYREP KKSSPLPIYL
#Glyma07g18350 LDR DYGLINN IHHDIGTHVI HHLFPQIPHY HLVEATEAAK PVFGKYYREP KKSSPLPFHL
#Glyma02g39230 VDR DYGWINN IHHDIGTHVI HHLFPQIPHY HLVEATQAAK PVLGDYYREP ERSAPLPFHL
#Glyma11g27190 VDR DYGWINN IHHDIGTHVI HHLFPQIPHY HLVEATKAAK AVLGKYYREP QKSGPLPLHL
#Glyma14g37350 VDR DYGWINN IHHDIGTHVI HHLFPQIPHY HLVEATQAAK SVLGEYYREP ERSAPLPFHL
#Glyma18g06950 VDR DYGWINN IHHDIGTHVI HHLFPQIPHY HLIEATKAAK AVLGKYYREP QKSGPLPLHL

#Glyma01g29630 IGELLRSMKK DHFVSNTGDI VYYQTDPTLS SSSTSQ--
#Glyma03g07570 IGELLRSMKK DHFVSDSGDI VYYQTDPTLS SSSTSQ--
#Glyma07g18350 IGELIRSFKT DHFVSDKGDV VYYQTDSEI GSSKSE--
#Glyma02g39230 IKYLIQSMRQ DHFVSDTGDV VYYQTDLSLL HSQRD---
#Glyma11g27190 IKYLLHSISQ DHFVSDYGDI VYYQTD SQFHKDSWTKSN
#Glyma14g37350 IKYLIQSMRQ DHFVSDTGDV VYYQTDLSHL HSHRD---
#Glyma18g06950 IKYLLHSISQ DHFVSDSGDI VYYQTD SQLHKDSWTKSN

```

Figura 7: Alinhamento das seqüências de aminoácidos das ω -3-dessaturases de soja. Os boxes de histidina estão destacados em vermelho e os domínios trans-membrana, em cinza.

A análise *in silico* do número de transcritos de cada gene permitiu identificar que onze dos quinze genes de dessaturases identificados apresentaram apenas um tipo de transcrito (Tabela 5). Dentre os genes que podem exibir *splicing* alternativo estão o Glyma20g24530, que apresentou cinco formas de transcritos, e os Glyma03g30070, Glyma14g37350 e Glyma01g29630, que apresentaram duas formas de transcritos cada. As diferenças entre os transcritos alternativos nesses genes foram encontradas principalmente nas regiões não codificantes. O desenho de *primers* para os experimentos de expressão gênica foi realizado de forma que com um único par de *primers* fosse possível a amplificação de todos os transcritos alternativos de cada gene de dessaturase.

Tabela 5: Características dos diferentes transcritos dos genes das dessaturases de ácidos graxos de soja

Gene	Transcrito	N° de pb do transcrito	N° de pb do CDS	N° de pb descrito do 5' UTR antes do ATG
Glyma02g36460	Glyma02g36460.1	1931	1326	104
Glyma03g30070	Glyma03g30070.1	1559	1163	76
	Glyma03g30070.2	1559	1152	87
Glyma09g17170	Glyma09g17170.1	1161	1161	-
Glyma10g42470	Glyma10g42470.1	1569	1164	234
Glyma15g23200	Glyma15g23200.1	764	764	-
Glyma19g32930	Glyma19g32930.1	963	963	-
Glyma19g32940	Glyma19g32940.1	1581	1152	94
Glyma20g24530	Glyma20g24530.1	1427	1164	42
	Glyma20g24530.2	1544	1164	159
	Glyma20g24530.3	1571	1164	186
	Glyma20g24530.4	1672	1164	287
	Glyma20g24530.5	1433	1140	72
Glyma01g29630	Glyma01g29630.1	2484	1359	650
	Glyma01g29630.2	2393	1359	559
Glyma02g39230	Glyma02g39230.1	1429	1143	103
Glyma03g07570	Glyma03g07570.1	2393	1362	687
Glyma07g18350	Glyma07g18350.1	2130	1362	442
Glyma11g27190	Glyma11g27190.1	1353	1146	64
Glyma14g37350	Glyma14g37350.1	1433	1131	96
	Glyma14g37350.2	1456	833	96
Glyma18g06950	Glyma18g06950.1	1385	1143	35

4.3.2 Análise de expressão *in silico*

O estudo da expressão gênica tem demonstrado ser uma importante ferramenta no entendimento dos processos biológicos em nível molecular. Estes estudos podem ser utilizados na identificação de redes de genes expressos no desenvolvimento do organismo ou até mesmo na determinação da função de um gene a partir da resposta a um estímulo externo.

O *Soybase* possui a ferramenta *RNA-Seq Atlas* que permite a análise transcritômica *in silico*, podendo verificar a expressão gênica em um banco de dados de microarranjos de DNA em 14 tipos de tecidos da soja. Os valores de expressão dos genes das ω -6-dessaturases e ω -3-dessaturases, utilizando o *RNA-Seq Atlas*, são apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Dentre as ω -6-dessaturases pode-se verificar que genes Glyma02g3646, Glyma03g30070 e Glyma19g32940 apresentam expressão em folhas, flor, vagem, raiz, nódulo e sementes em desenvolvimento (Tabela 6). Esses genes apresentam maior expressão nos estádios iniciais do desenvolvimento da semente. Em contrapartida, os genes Glyma10g42470 e Glyma20g24530 apresentam expressão maior nos estádios finais do desenvolvimento da semente. Os genes Glyma09g17170 e Glyma15g23200 apresentam baixa expressão nos diferentes tecidos avaliados e durante o desenvolvimento das sementes. Já o gene Glyma19g32930 não apresentou expressão em nenhum tecido avaliado.

Os genes das ω -3-dessaturases apresentaram expressão em todos os tecidos avaliados (Tabela 7). Durante o desenvolvimento das sementes os genes Glyma01g29630, Glyma02g39230 e Glyma03g07570 sofreram pouca variação nos níveis de expressão. Já o gene Glyma18g06950 teve maior expressão nos estádios iniciais e intermediários, e o gene Glyma14g37350 apresentou maior expressão nos estádios finais do desenvolvimento da semente.

Para complementar as análises realizadas *in silico* foi realizado um *virtual northern blotting* (VNB) utilizando o banco de EST do NCBI. A representatividade no banco de dados e a expressão tecido-específica de cada transcrito foram avaliadas e estão representadas nas Figura 8 para as ω -6-dessaturases e Figura 9 para as ω -3-dessaturases.

Tabela 6: Análise *in silico* do transcriptoma das ω -6-dessaturases no Atlas de *RNA-Seq* do Soybase.

Gene	Folha	flor	vagem 1cm	vagem 10DAF	vagem 14DAF	semente 10DAF	semente 14DAF	semente 21DAF	semente 25DAF	semente 28DAF	semente 35DAF	semente 42DAF	raiz nódulo	
Glyma02g36460	21	11	8	9	8	14	4	3	2	1	1	0	3	4
Glyma03g30070	112	69	174	116	204	12	40	40	33	15	25	15	32	13
Glyma09g17170	0	4	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	0	4
Glyma10g42470	4	0	0	0	0	0	1	8	63	93	237	262	0	0
Glyma15g23200	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Glyma19g32930	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glyma19g32940	299	102	259	280	197	21	48	62	44	22	31	16	33	114
Glyma20g24530	2	0	0	0	0	0	10	54	411	288	775	668	0	0

Tabela 7: Análise *in silico* do transcriptoma das ω -3-dessaturases no Atlas de *RNA-Seq* do Soybase.

Gene	Folha	flor	vagem 1cm	vagem 10DAF	vagem 14DAF	semente 10DAF	semente 14DAF	semente 21DAF	semente 25DAF	semente 28DAF	semente 35DAF	semente 42DAF	raiz nódulo	
Glyma01g29630	25	9	7	10	15	4	5	4	2	2	3	1	2	1
Glyma02g39230	19	11	29	48	25	5	13	12	13	8	15	7	10	10
Glyma03g07570	24	12	5	6	8	3	5	5	3	3	4	3	2	2
Glyma07g18350	1	4	2	10	15	1	1	1	1	0	1	0	1	2
Glyma11g27190	4	1	2	2	1	1	4	3	2	1	0	0	2	1
Glyma14g37350	5	4	3	2	3	6	5	9	5	8	18	10	4	1
Glyma18g06950	32	4	13	13	3	12	35	23	9	5	10	8	1	1

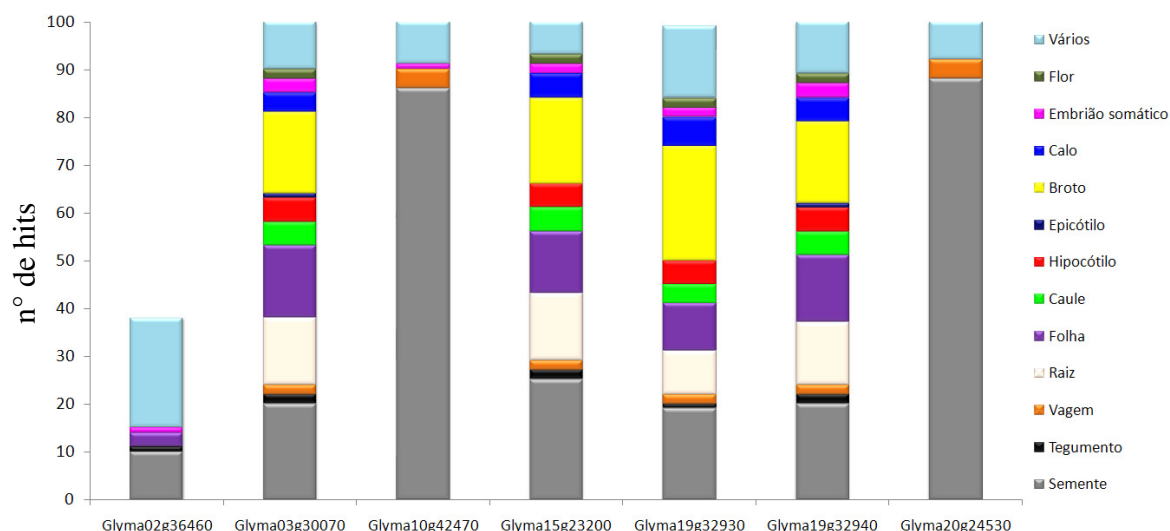


Figura 8: Avaliação da representatividade e expressão tecido-específica dos genes das ω -6-dessaturases em um banco composto de 394.070 ESTs

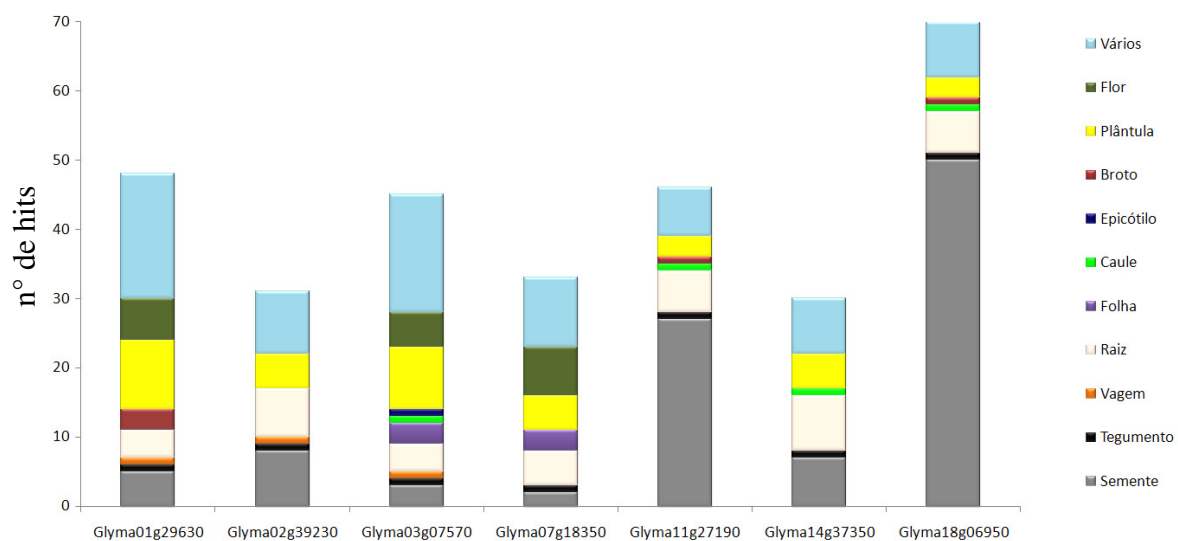


Figura 9: Avaliação da representatividade e expressão tecido-específica dos genes das ω -3-dessaturases em um banco composto de 394.070 ESTs.

Quinze genes das ω -3 e ω -6 dessaturases apresentaram expressão em diferentes tecidos, como: flores, broto, caule, raiz, vagem, tegumento e em sementes. Apenas o gene Glyma09g17170 não apresentou nenhum *hit* no *blast* realizado contra as bibliotecas de ESTs do NCBI. Esse dado juntamente com os resultados de expressão *in silico* no Atlas de RNA-seq do *Soybase* indicam que esse gene tenha uma expressão reduzida ou até mesmo não seja expresso.

As sequências dos genes Glyma10g4270 e Glyma20g4530 (ω -6-dessaturases) apresentaram mais de 80 *hits* em sementes no *Blast* realizado nas bibliotecas de ESTs do NCBI (Figura 8). Em conformidade, essas mesmas sequências são as que apresentaram maiores *hits* na análise *in silico* do transcriptoma no Atlas de *RNA-Seq* do *Soybase* durante o desenvolvimento da semente (Tabela 4) e nas análises do *Genevestigator* (banco de dados de microarranjos de DNA) realizadas por Chi (2011), suportando a hipótese de que esses genes são os principais codificadores das ω -6 dessaturases envolvidas na biossíntese de ácido linoléico em sementes de soja em desenvolvimento.

As sequências dos genes Glyma02g3923; Glyma11g27190, Glyma14g37350 e Glyma18g06950 (ω -3-dessaturases) apresentaram um grande número de *hits* em sementes no *blast* realizado nas bibliotecas de ESTs do NCBI (Figura 9). Esses dados corroboram os dados apresentados na análise *in silico* do transcriptoma no Atlas de *RNA-Seq* do *Soybase* durante o desenvolvimento da semente (Tabela 5). Análises da expressão das ω -3-dessaturases no *Genevestigator* realizadas por Chi (2011) foi possível verificar que o Glyma14g37350 foi o que apresentou a maior expressão em sementes. Em conjunto, esses dados dão suporte à hipótese que esses são os principais genes envolvidos na biossíntese de ácido linolênico em sementes de soja em desenvolvimento.

4.3.3 Acúmulo de transcritos das ω -6 e ω -3 dessaturases

O efeito da temperatura de cultivo na expressão dos genes das dessaturases de ácidos graxos foram determinados nos genótipos FA22 e CD219 no 5° e 8° estágio de desenvolvimento das sementes. Inicialmente, foram padronizadas as condições de reações para a validação dos *primers* nos experimentos. A eficiência de amplificação de cada um dos *primers* foi calculada plotando-se graficamente os valores obtidos de Ct no eixo das ordenadas e o logaritmo dos valores de cada diluição no eixo das abscissas. O valor do coeficiente angular (*s*) da reta é utilizado para o cálculo da eficiência, utilizando a fórmula: Eficiência PCR = $(10^{(1/-s)} - 1) \times 100$. Coeficiente com valor de -3,32 indica que a reação de PCR apresenta 100% de eficiência (Ginzinger, 2002).

Dentre os 18 genes avaliados, apenas dois (Glyma09g17170 e Glyma19g32930) tiveram *primers* com eficiências de amplificação inferiores a 80%, não sendo indicada a

utilização nas análises de expressão gênica. Esse fato se deve principalmente a baixa expressão desses genes nas sementes pois apresentaram valores de Ct muito alto, até mesmo nos pontos de maior concentração de cDNA. As demais eficiências de amplificação dos *primers* foram em sua maioria superior a 90% (Tabela 8). Esses valores elevados de eficiência validam o experimento e conseqüentemente permitem as análises de quantificação de transcrito utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabela 8: Cálculo da eficiência de amplificação dos pares de *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real

Gene	Coefficiente angular	r*	Eficiência (%)
Glyma02g36460	-3,558	0,995	91%
Glyma03g30070	-3,287	0,984	99%
Glyma10g42470	-3,489	0,997	93%
Glyma15g23200	-3,431	0,988	96%
Glyma19g32940	-3,252	0,997	97%
Glyma20g24530	-3,592	0,998	90%
Glyma01g29630	-3,3182	0,996	99%
Glyma02g39230	-3,579	0,996	90%
Glyma03g07570	-3,206	0,954	94%
Glyma07g18350	-3,0901	0,997	90%
Glyma11g27190	-3,249	0,997	96%
Glyma14g37350	-3,035	1,000	86%
Glyma18g06950	-3,342	0,985	99%
ACT11	-3,597	0,995	90%
UNK1	-3,14	0,978	92%
UNK2	-3,102	0,999	90%
CONS7	-3,474	0,998	94%

* r coeficiente de correlação da curva de eficiência.

Os parâmetros estatísticos para a investigação da estabilidade da expressão dos quatro genes endógenos (ACT11, UNK1, UNK2 e CONS7) estão nas Tabelas 9 e 10. Quanto maior o coeficiente de correlação (r) e menor o desvio padrão, maior a estabilidade de expressão do gene, o que aumenta a chance deste gene ser selecionado como controle endógeno. Conforme mostrado na Tabela 7 todos os genes endógenos testados nas sementes do 5º estágio de desenvolvimento apresentaram elevado coeficiente de correlação ($r > 0,90$) e desvio padrão baixo (menor que 2). Assim, os quatro genes apresentam expressão estável na condição experimental avaliada e foram utilizados em conjunto para os cálculos de quantificação relativa da expressão gênica

das dessaturases de soja. Porém, nas sementes no 8° estágio de desenvolvimento o gene CONS7 não se apresentou estável e dessa forma não foi incluído nas análises para esse estágio de desenvolvimento (Tabela 10).

Tabela 9: Dados estatísticos gerados pelo programa *Bestkeeper* para os quatro genes endógenos avaliados no 5° estágio de desenvolvimento

Parâmetro estatístico	ACT11	UNK1	UNK2	CONS7
Média geométrica [dos CTs]	21,29	26,04	28,11	24,36
Desvio Padrão [\pm CT]	0,81	0,35	0,52	0,67
Coefficiente de variação [% CT]*	3,79	1,34	1,86	2,75
Desvio padrão [\pm x-fold]**	1,68	1,25	1,40	1,59
Coefficiente de correlação [r]	0,991	0,926	0,984	0,984
<i>p-value</i>	0,001	0,001	0,001	0,001

* Coeficiente de variação, expresso como porcentagem do número do Ct.

** Desvio padrão dos coeficientes absolutos.

Tabela 10: Dados estatísticos gerados pelo programa *Bestkeeper* para os quatro genes endógenos avaliados no 8° estágio de desenvolvimento

Parâmetro estatístico	ACT11	UNK1	UNK2	CONS7
Média geométrica [dos CTs]	21,95	24,71	27,98	25,52
Desvio Padrão [\pm CT]	0,79	0,70	0,60	0,63
Coefficiente de variação [% CT]*	3,63	2,84	2,14	2,45
Desvio padrão [\pm x-fold]**	1,74	1,62	1,51	1,54
Coefficiente de correlação [r]	0,921	0,970	0,901	0,761
<i>p-value</i>	0,001	0,001	0,001	0,004

* Coeficiente de variação, expresso como porcentagem do número do Ct.

** Desvio padrão dos coeficientes absolutos.

Os dados normalizados de expressão gênica relativa comparativos entre os 13 genes avaliados são apresentados nas Figuras 10, 11, 12 e 13. Em todas as condições testadas os genes das ω -6-dessaturases Glyma10g42470 e Glyma20g24530 apresentaram os maiores valores de expressão relativa, corroborando os dados de expressão *in silico* (Tabela 6 e Figura 9). Esses dois genes apresentam expressão semente-específica e são tidos como os principais responsáveis pela biossíntese de ω -6-dessaturases de ácidos graxos destinados à reserva (Heppard *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2008).

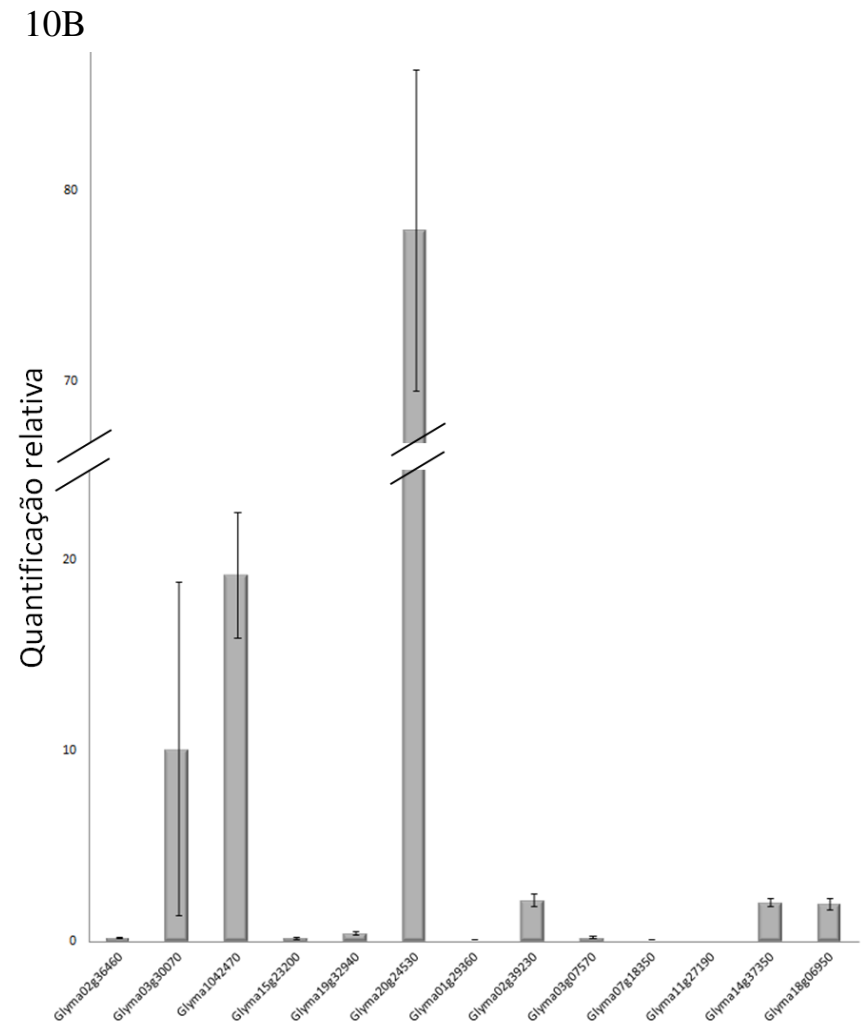
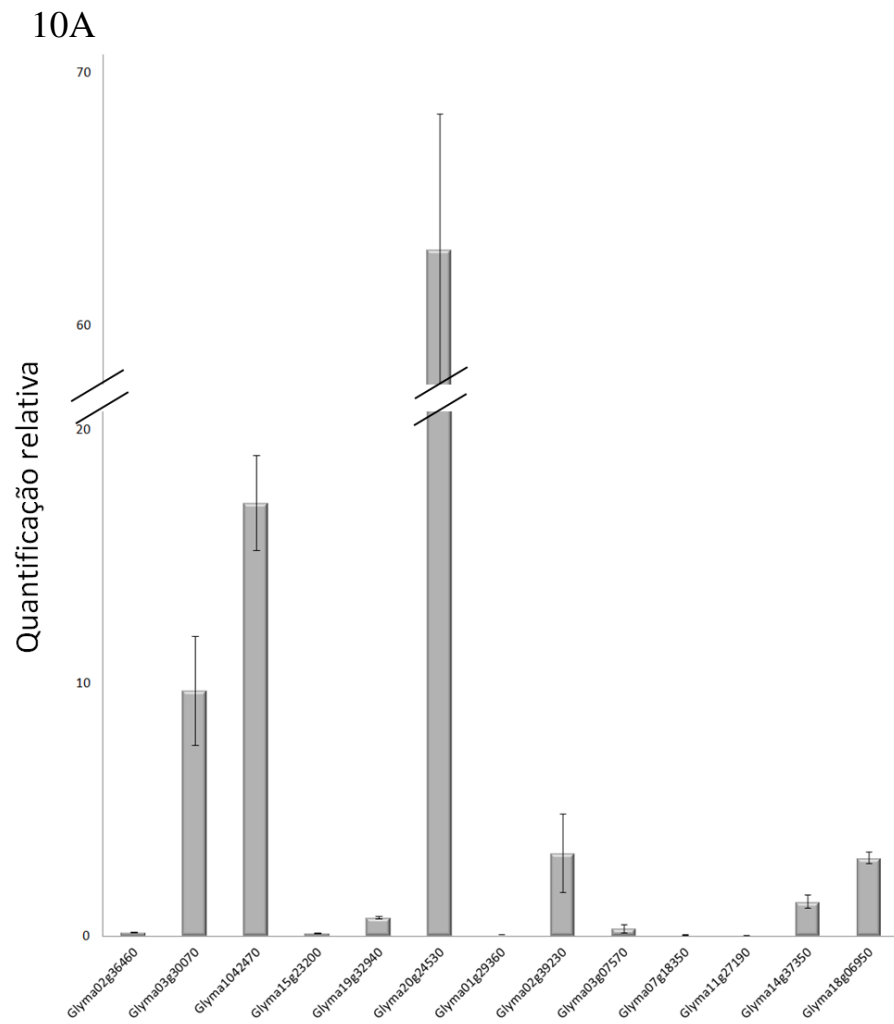


Figura 10: Expressão gênica relativa das dessaturases em sementes de soja em desenvolvimento no genótipo CD219 cultivada a 26°/14°C. 10A - Sementes no 5° estágio de desenvolvimento (176 a 225 mg). 10B - Sementes no 8° estágio de desenvolvimento (375 a 425 mg). as barras representam o erro padrão da média.

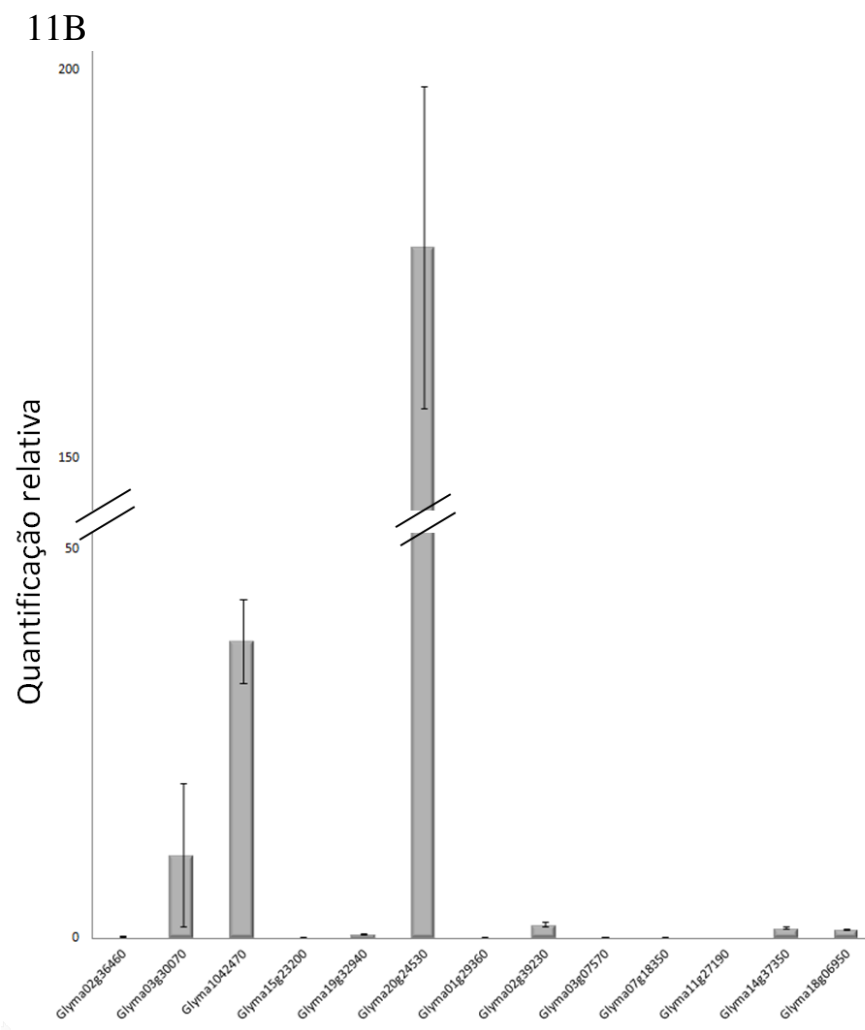
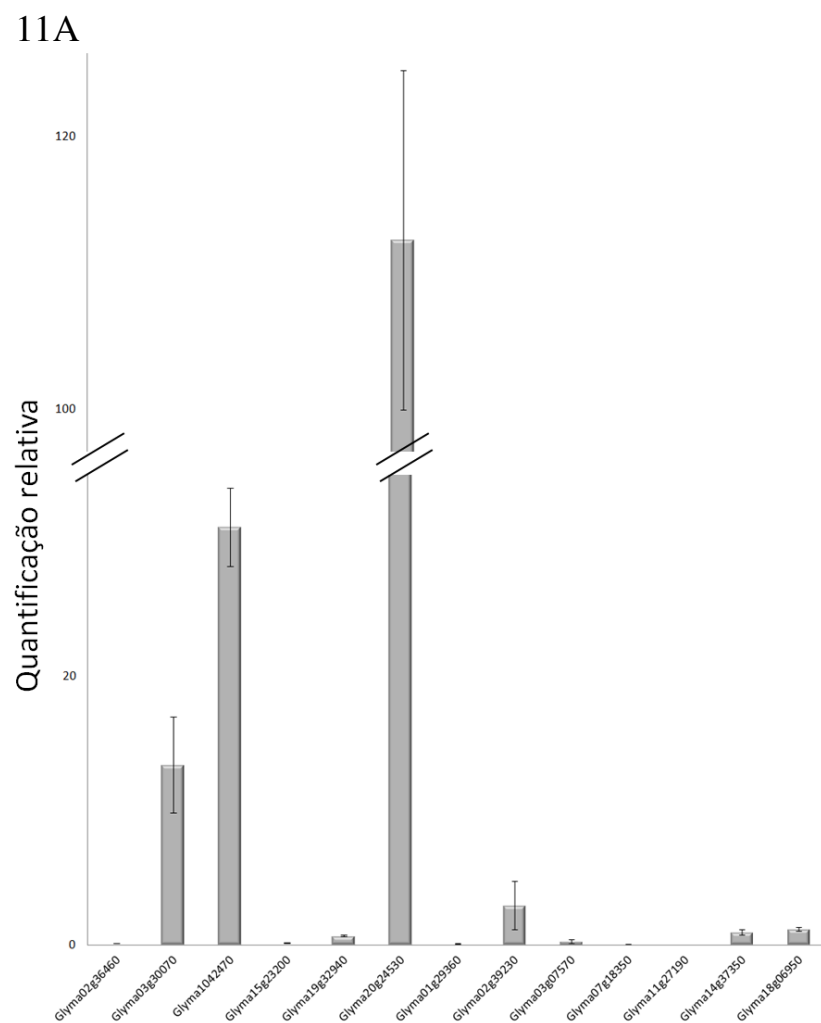


Figura 11: Expressão gênica relativa das dessaturases em sementes de soja em desenvolvimento no genótipo CD219 cultivada a 32°/27°C. 11A - Sementes no 5° estágio de desenvolvimento (176 a 225 mg). 11B - Sementes no 8° estágio de desenvolvimento (375 a 425 mg). As barras representam o erro padrão da média.

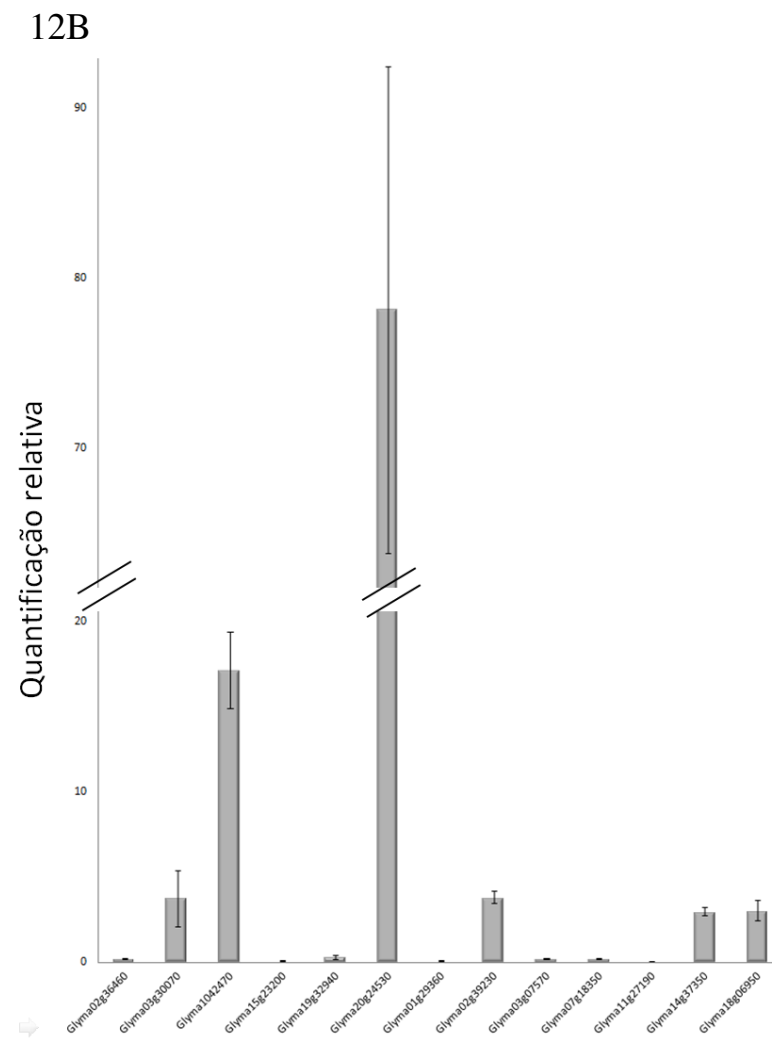
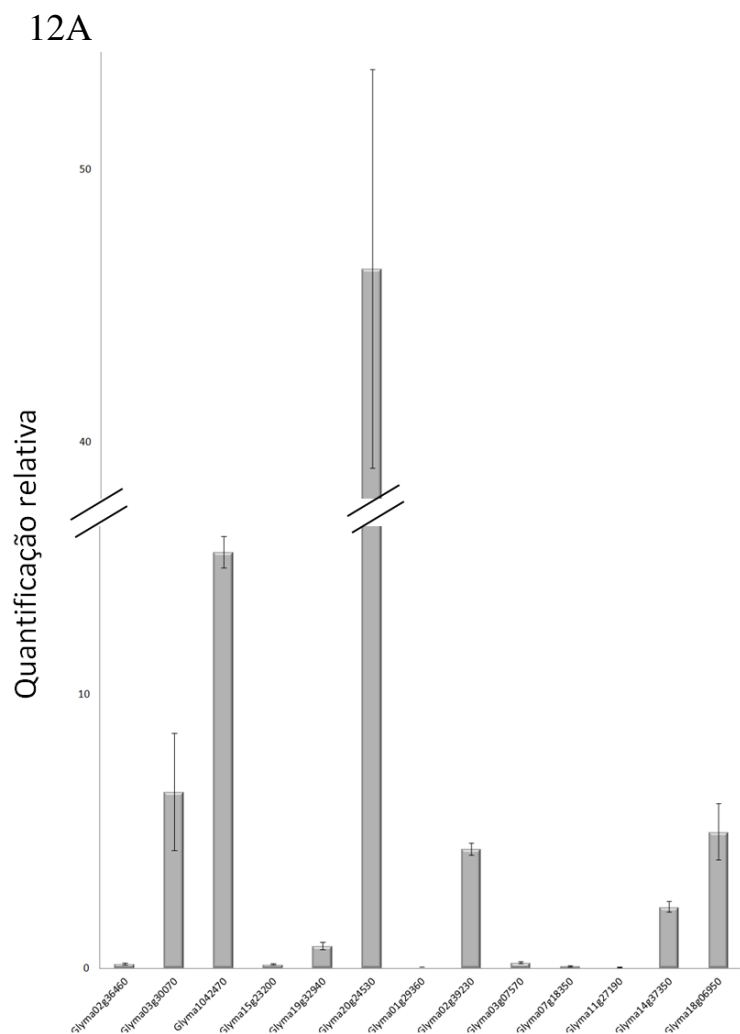


Figura 12: Expressão gênica relativa das dessaturases em sementes de soja em desenvolvimento no genótipo FA22 cultivada a 26°/14°C. 12A - Sementes no 5° estágio de desenvolvimento (176 a 225 mg). 12B - Sementes no 8° estágio de desenvolvimento (375 a 425 mg). As barras representam o erro padrão da média.

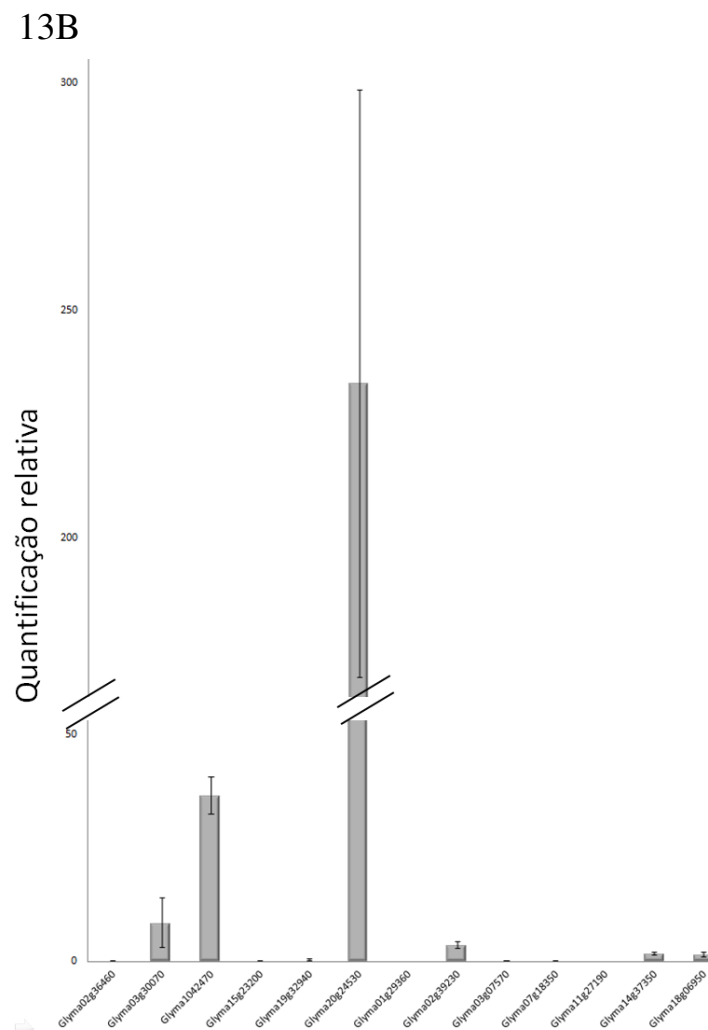
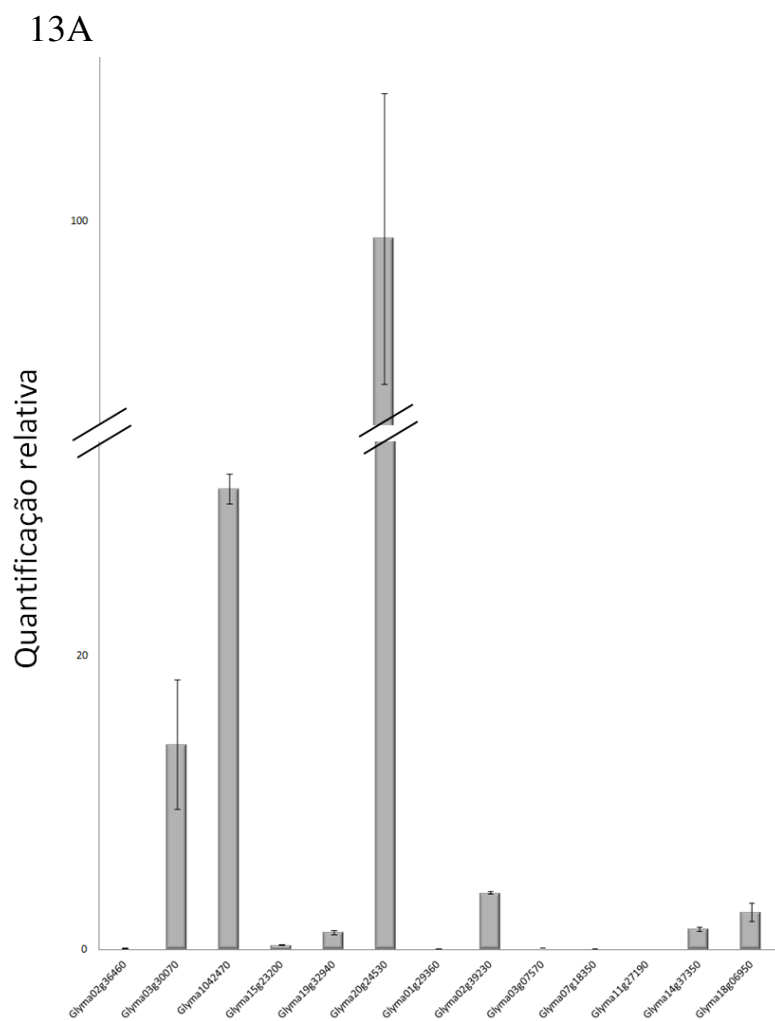


Figura 13: Expressão gênica relativa das dessaturases em sementes de soja em desenvolvimento no genótipo FA22 cultivada a 32°/27°C. 13A - Sementes no 5º estágio de desenvolvimento (176 a 225 mg). 13B - Sementes no 8º estágio de desenvolvimento (375 a 425 mg). As barras representam o erro padrão da média.

Nas ω -3-dessaturases, os genes Glyma02g39230; Glyma14g37350 e Glyma18g06950 apresentaram os maiores valores de quantificação relativa frente aos demais genes das ω -3-dessaturases, confirmando os dados de expressão *in silico* (Tabela 5 e Figura 9) e por Bilyeu *et al.* (2003).

Os dados normalizados de expressão gênica relativa das ω -6-dessaturases comparativos para os genótipos CD219 e FA22 nas duas temperaturas de cultivo são apresentados nas Figuras 14 e 15. Dos seis genes avaliados, dois (Glyma10g42470 e Glyma20g24530) apresentaram o aumento no acúmulo de transcritos em função da maior temperatura (32/27°C) de cultivo das sementes no 5° e 8° estágio de desenvolvimento. Essa diferença observada é contrária a esperada, uma vez que o aumento da temperatura leva a redução do conteúdo de ácidos graxos polinsaturados (linoléico e linolênico).

Resultados semelhantes foram encontrados por Happard *et al.* (1996) em que foi verificado aumento de oito vezes na expressão do gene Glyma10g42470 em temperaturas mais elevadas e por Schlueter (2007) que verificou o aumento nos níveis de expressão do gene Glyma10g42470 e Glyma20g24530 nas temperaturas mais elevadas. O aumento nos níveis de transcritos desses genes possivelmente se deve ao fato da instabilidade das ω -6-dessaturases em altas temperaturas (Heppard *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2005).

Assim como os genes Glyma10g42470 e Glyma20g24530, em sementes do 5° estágio de desenvolvimento do genótipo FA22 os genes Glyma15g23200 e Glyma19g32940 apresentaram maior expressão quando as plantas foram cultivadas na temperatura mais elevada (Figura 14).

O gene Glyma03g30070 não apresentou expressão diferenciada em função da temperatura de cultivo (Figura 14 e 15). Contrariamente, Schlueter *et al.* (2007) verificaram que esse gene apresenta nível de expressão oito vezes menor em plantas cultivadas em temperaturas elevadas em relação a plantas cultivadas em baixas temperaturas. Segundo Schlueter *et al.* (2007), o gene Glyma03g30070 é o principal responsável pelas alterações no conteúdo de ácido oléico/linoléico frente às variações de temperatura. Possivelmente as diferenças observadas entre o presente estudo e os de Schlueter *et al.* (2007) se devam aos diferentes genótipos avaliados.

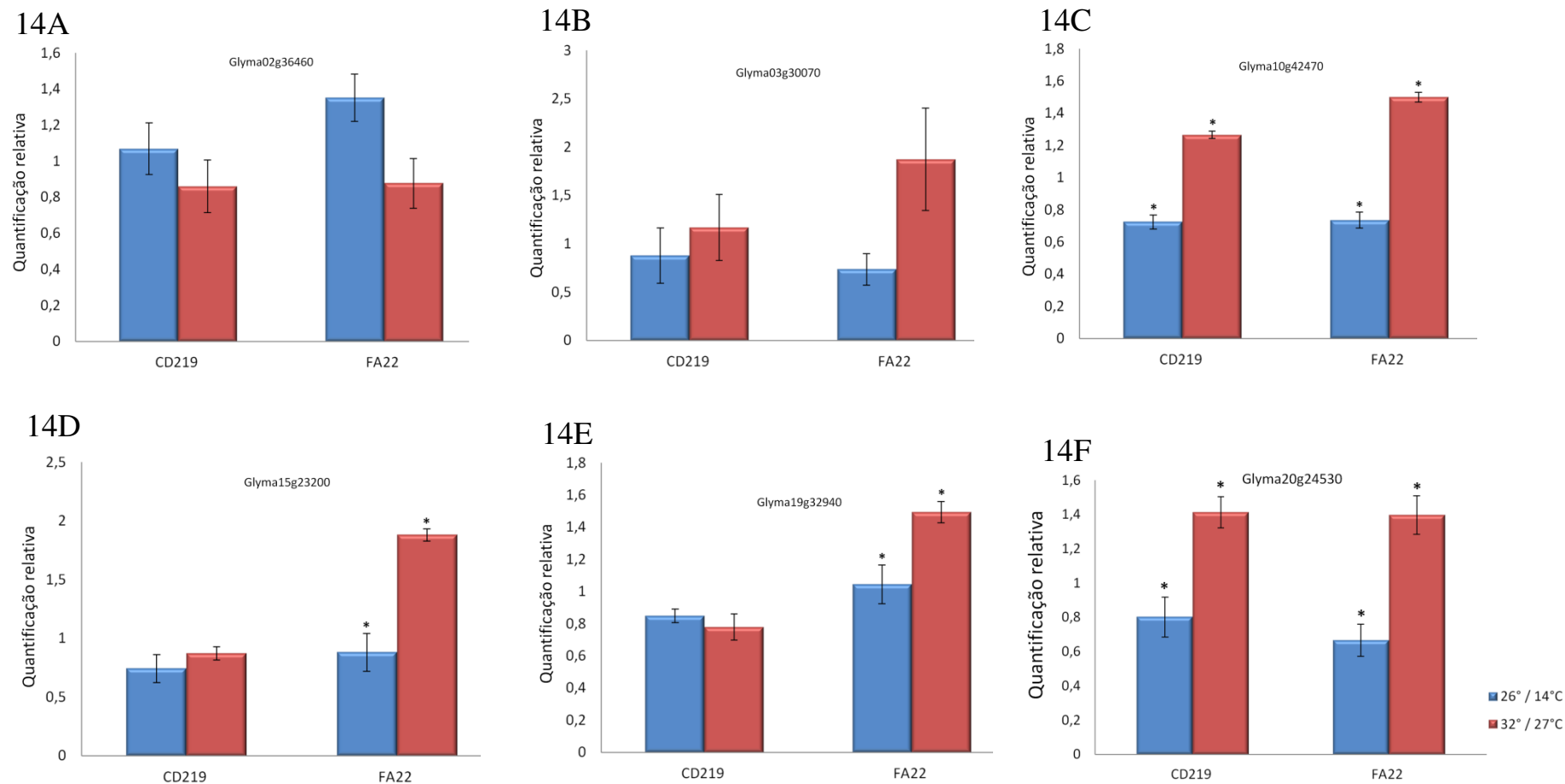


Figura 14: Expressão gênica das ω -6-dessaturases em sementes de soja no 5° estágio de desenvolvimento (176 a 225 mg) em genótipos contrastantes para os teores de ácido oléico e linolênico cultivados sob diferentes temperaturas. As barras representam o erro padrão da média. Médias marcadas com um asterisco dentro do mesmo genótipo diferem estatisticamente pelo teste t a 5% de probabilidade.

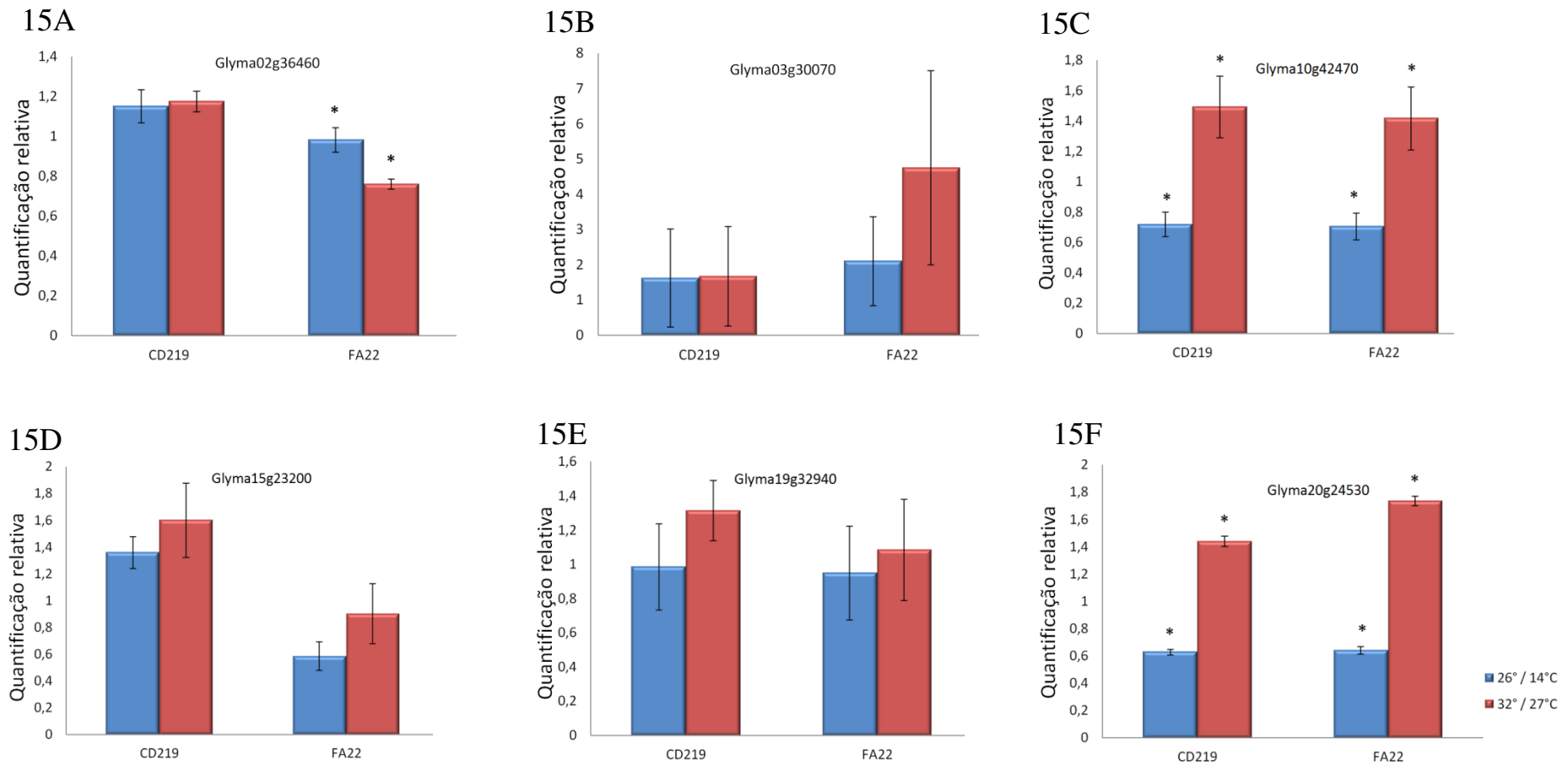


Figura 15: Expressão gênica das ω -6-dessaturases em sementes de soja no 8º estágio de desenvolvimento (375 a 425 mg) em genótipos contrastantes para os teores de ácido oléico e linolênico cultivados sob diferentes temperaturas. As barras representam o erro padrão da média. Médias marcadas com um asterisco dentro do mesmo genótipo diferem estatisticamente pelo teste t a 5% de probabilidade.

Apenas o gene Glyma02g36460 em sementes do 8º estágio de desenvolvimento do genótipo FA22 apresentou alterações no perfil de expressão que pudessem explicar as alterações no conteúdo de ácido oléico/linoléico em função da temperatura de cultivo. No entanto, esse gene codifica uma ω -6-dessaturase cloroplastidial que é responsável principalmente pela biossíntese de ácidos graxos direcionados às membranas celulares, contribuindo muito pouco para o conteúdo total de ácidos graxos nas sementes. Desta forma, outros mecanismos de regulação pós transcricionais podem estar modulando a atividade das ω -6-dessaturases em função da temperatura de cultivo nos genótipos FA22 e CD219.

Cheesbrough (1989) avaliou a atividade enzimática das dessaturases em plantas cultivadas inicialmente em casa de vegetação com temperaturas de 28/25°C e posteriormente cultivadas por 20 h a 20°C e 25°C. As atividades de ω -3 e ω -6 dessaturases foram, respectivamente, 94 e 10 vezes mais ativas, nas sementes cultivadas tanto a 20°C como a 25°C. Esses resultados sugerem que as dessaturases podem ser rapidamente reguladas devido a alterações na temperatura.

Muitas teorias têm sido propostas para explicar a variação da atividade das ω -6-dessaturases frente a variações da temperatura de cultivo. Inicialmente, acreditava-se que a diferença de solubilidade de O₂ no citoplasma pudesse regular atividade da enzima. Uma teoria alternativa sugere que este fenômeno possa ser devido à modulação da fluidez da membrana, de forma a alterar a exposição do sítio ativo da enzima no citosol. Os modelos são bastante interessantes, mas não descrevem adequadamente o mecanismo biológico que medeia os efeitos da temperatura sobre a atividade de dessaturase (Wilson, 2004).

Atualmente, acredita-se que a atividade possa ser regulada por eventos de transdução de sinais que resultam na fosforilação da enzima. Tang (2005) sugere que o resíduo de serina na posição 185 da ω -6-dessaturase, possa ser fosforilado por cinases. A substituição do resíduo de serina 185 por aspartato ou glutamato resultou na redução da atividade, indicando que a fosforilação leva a inibição da atividade enzimática.

Além disso, a meia vida da enzima pode ser mediada por mecanismos de ubiquitinação e degradação via proteassoma (Tang *et al.*, 2005). A partir de análises proteômicas de sementes de soja do genótipo Ningzhen foi possível verificar a redução do acúmulo de proteínas de ω -6-dessaturases com o cultivo da soja a 40/30°C e

100/70% umidade relativa do ar, quando comparadas com plantas cultivadas a 30/20°C e 70% umidade relativa do ar (Wang *et al.*, 2012).

Os dados normalizados de expressão gênica relativa das ω -3-dessaturases comparativos nas duas temperaturas de cultivo são apresentados nas Figura 16 e 17. Os genes Glyma01g29360, Glyma03g07570 e Glyma07g18350 não apresentaram variação nos níveis de expressão em função da temperatura de cultivo. Esses três genes codificam ω -3-dessaturases cloroplastidiais, evidenciando mecanismos de regulação similares para esses genes frente a variações da temperatura de cultivo.

Os genes Glyma11g27190 e Glyma14g37350 apresentaram redução no acúmulo de transcritos quando as semente foram cultivadas em temperaturas mais elevadas (32/27°C) apenas no genótipo FA22. O gene Glyma18g06950 apresentou perfil de expressão que pode explicar as alterações no conteúdo de ácido linoléico/linolênico nos genótipos FA22 e CD219 em função da temperatura nos dois estádios avaliados. O gene Glyma02g39230 apresentou o mesmo efeito em função da temperatura de cultivo, porém apenas no 8º estágio de desenvolvimento.

Esses dados corroboram os estudos realizados por Byfield & Upchurch (2007), em que foram avaliados os genes Glyma14g37350, Glyma02g39230 e Glyma18g06950 em três temperaturas de cultivo (30/29°C, 26/22°C e 22/18°C) nos genótipos de soja Dare, N99-3170 e N01-3544. Em sementes com 35 dias após florescimento, o acúmulo de transcrito reduziu de 5 a 15 vezes para o gene Glyma14g37350, 2 a 9 vezes para o gene Glyma02g39230 e 2 a 3 vezes para o gene Glyma18g06950 em sementes desenvolvidas em um ambiente quente (30/26°C) vs. ambientes normais (26/22°C) ou frios (22/18°C). As reduções dos níveis de transcritos dos genes foram positivamente associadas à redução no conteúdo de ácido linolênico nas sementes dos três genótipos analisados.

Desse modo, a regulação transcricional do gene da ω -3-dessaturase, pelo menos em parte, explica as alteração na composição de ácidos graxos em diferentes temperaturas nos genótipos avaliados.

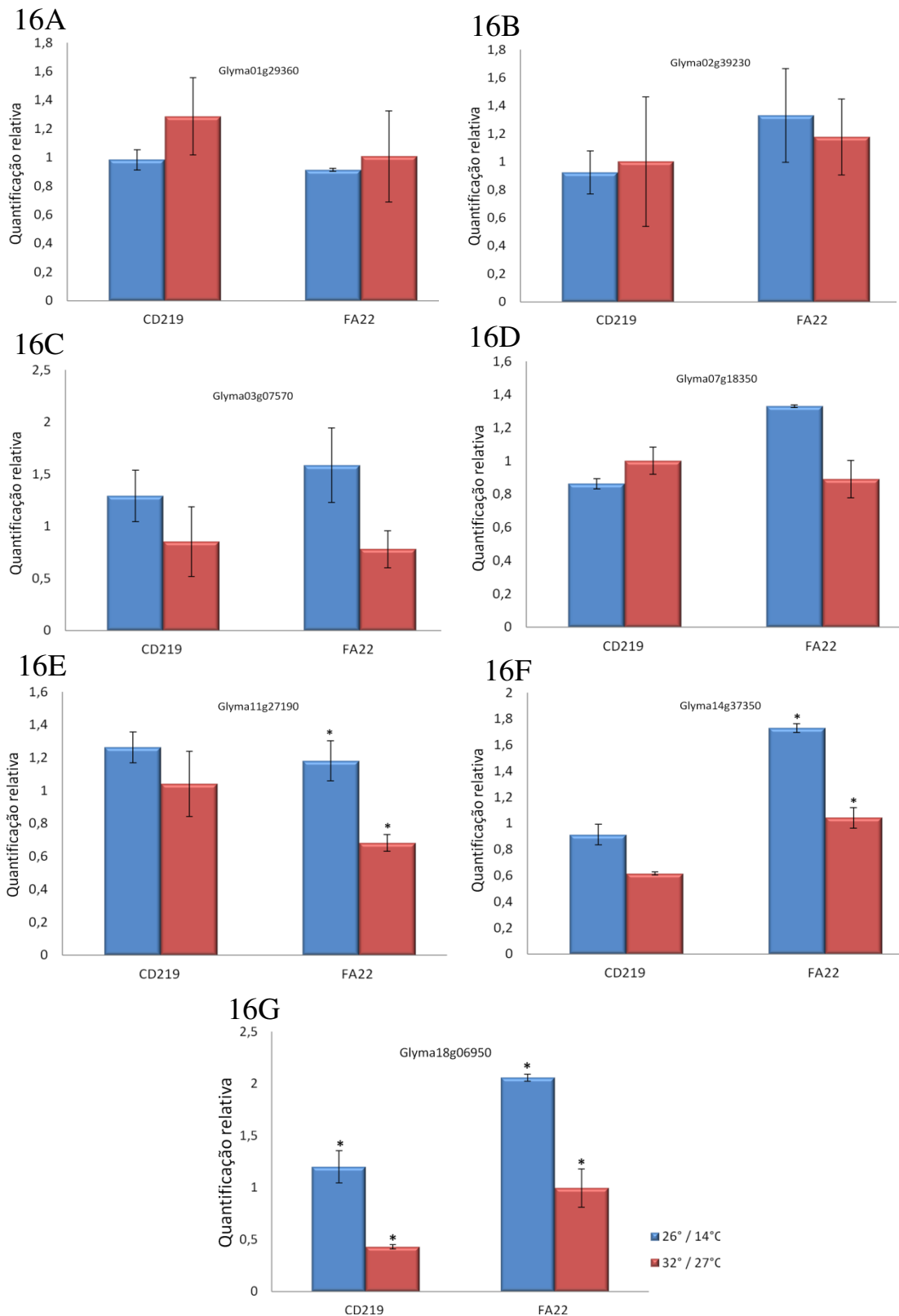


Figura 16: Expressão gênica das ω -3-dessaturases em sementes de soja no 5º estágio de desenvolvimento (176 a 225 mg) em genótipos contrastantes para os teores de ácido oléico e linolênico cultivados sob diferentes temperaturas. As barras representam o erro padrão da média. Médias marcadas com um asterisco dentro do mesmo genótipo diferem estatisticamente pelo teste t a 5% de probabilidade.

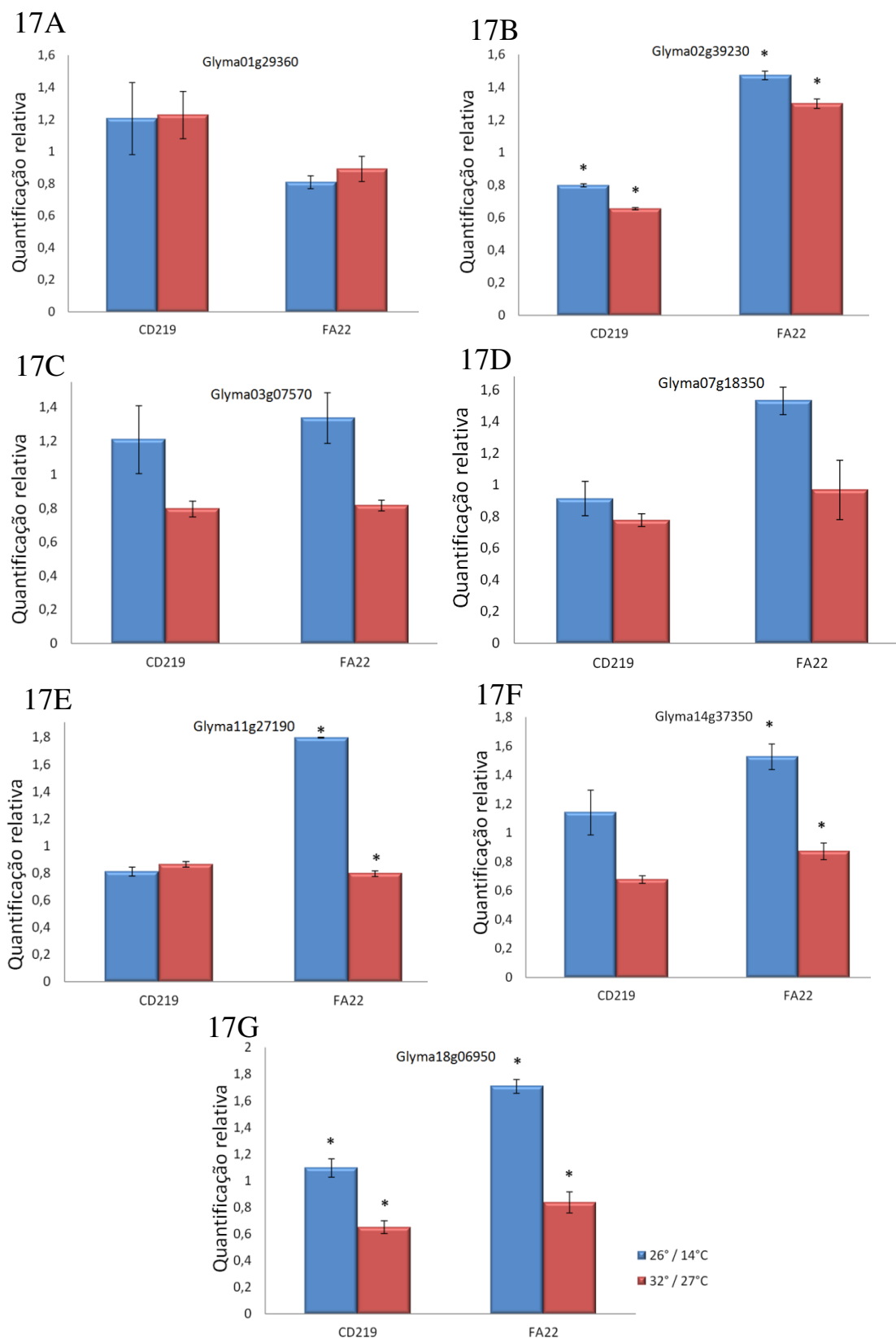


Figura 17: Expressão gênica das ω -3-dessaturases em sementes de soja no 8^o estágio de desenvolvimento (375 a 425 mg) em genótipos contrastantes para os teores de ácido oléico e linolênico cultivados sob diferentes temperaturas. As barras representam o erro padrão da média. Médias marcadas com um asterisco diferem estatisticamente pelo teste t a 5% de probabilidade.

5 Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- Não foi observado efeito significativo da temperatura de cultivo no teor de óleo bruto em sementes maduras dos genótipos CD219, A29 e FA22;
- O aumento da temperatura de cultivo da soja promoveu o aumento do conteúdo de ácido oléico e redução do conteúdo de ácidos linoléico e linolênico nos genótipos CD219 e FA22 em sementes maduras;
- Os perfis do acúmulo de ácido graxos insaturados durante a ontogenia das sementes foram diferenciados em função do genótipo. FA22 apresentou maior conteúdo de ácido oléico e menor conteúdo de ácido linolênico em sementes cultivadas em alta temperatura em todos os estádios de desenvolvimento. Enquanto que em CD219 esse efeito foi observado apenas nos estádios finais;
- Quinze genes foram identificados como potenciais constituintes da família das dessaturases: 8 referentes referente às ω -6-dessaturases e 7 referentes às ω -3-dessaturases;
- Os genes Glyma10g42470 e Glyma20g24530 (ω -6-dessaturases) apresentaram os maiores valores de expressão relativa em sementes de soja em desenvolvimento;
- Os genes Glyma02g39230; Glyma14g37350 e Glyma18g06950 (ω -3-dessaturases) apresentaram os maiores valores de expressão relativa em sementes de soja em desenvolvimento;
- Os genes das ω -6-dessaturases Glyma10g42470, Glyma15g23200 e Glyma20g24530 apresentaram maior acúmulo de transcritos na faixa de temperaturas mais elevadas (32/27°C) de cultivo nas sementes em desenvolvimento, indicando outros níveis de regulação;
- O gene da ω -3-dessaturases Glyma18g06950 apresentou perfil de expressão que pudessem explicar as alterações no conteúdo de ácido linoléico/linolênico nos genótipos FA22 e CD219 em função da temperatura nas sementes de soja em desenvolvimento.

6 Referências bibliográficas

- ANDREU, V.; LAGUNAS, B.; COLLADOS, R.; PICOREL, R.; ALFONSO, M. The GmFAD7 gene family from soybean: identification of novel genes and tissue-specific conformations of the FAD7 enzyme. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 3371–3384, 2010.
- BAUD, S.; LEPINIEC, L. Physiological and developmental regulation of seed oil production. **Progress in Lipid Research**, v. 49, p. 235-49, 2010.
- BILYEU, K. D.; PALAVALLI, L.; SLEPER, D. A.; BEUSELINCK, P. R. Three microsomal omega-3 fatty-acid desaturase genes contribute to soybean linolenic acid level. **Crop Science**, v. 43, p.1833–1838, 2003.
- BYFIELD, G. E.; UPCHURCH, R. G. Effect of temperature on delta-9 stearyl-*acp* and microsomal omega-6 desaturase gene expression and fatty acid content in developing soybean seeds. **Crop Science**, v. 47, p. 1698-1704, 2007.
- CHI, X.; YANG, Q.; LU, Y.; WANG, J.; ZHANG, Q.; PAN, L.; CHEN, M.; HE, Y.; YU, S. Genome-Wide analysis of Fatty Acid Desaturases in Soybean (*Glycine max*). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 29, p. 769-783, 2011.
- CHEESBROUGH, T. M. Changes in the enzymes for fatty acid synthesis and desaturation during acclimation of developing soybean seeds to altered growth temperature. **Plant Physiology** v. 90, p. 760-764, 1989.
- COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F. The utilization of used frying oil for the production of biodiesel. **Química Nova**, v. 23, p. 531-537, 2000.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa, MG. 442p. 1997.
- FARHOOSH, R.; EINAFFSHAR, S.; SHARAYEI, P. The effect of commercial refining steps on the rancidity measures of soybean and canola oils. **Food Chemistry**, v. 115, p. 933–938, 2009.
- FEHR, W. R. Breeding for Modified Fatty Acid Composition in Soybean. **Crop Science**, v. 47, p. S-72-87S, 2007.
- GINZINGER, D. G.; Gene quantification using real-time quantitative PCR: An

emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 503–512, 2002.

HASHIMOTO, K.; YOSHIZAWA, A.C.; OKUDA, S.; KUMA, K.; GOTO, S.; KANEHISA, M. The repertoire of desaturases and elongases reveals fatty acid variations in 56 eukaryotic genomes. **Journal of lipid research**, v.49, p. 183-91, 2008.

HEPPARD, E. P.; KINNEY, A. J.; STECCA, K. L.; MIAO, G. H. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal ω -6-desaturase genes in soybeans. **Journal Plant Physiology**, v. 110, p. 311-319, 1996.

HU, R.; FAN, C. ; Li, H.; ZHANG, Q.; Fu, Y. F. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, v.93 p.1-12 , 2009.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**; Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3° ed. São Paulo. v. 1, 533 p, 1985.

JHAM, G. N.; TELLES, F. F. F.; CAMPOS, L. G. Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. **Journal of the American oil Chemists Society**, v. 59, p. 132-133, 1982.

KNOTHE, G Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Processing Technology**, v. 88, p. 669-677, 2007.

LANNA, A. C. **Efeito da temperatura sobre a regulação da síntese de ácidos graxos polinsaturados em soja**. Tese de Doutorado, UFV, Viçosa, MG, 84p. 2002.

LEE, J. D. ; BILYEU, K. D.; SHANNON, J. G. Genetics and breeding for modified fatty acid profile in soybean seed oil. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 10, p. 201-210, 2007.

LI, L.; WANG, X.; GAI, J.; YU, D. Molecular cloning and characterization of a novel microsomal oleate desaturase gene from soybean. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1516-1526, 2007.

LI, L.; WANG, X.; GAI, J.; YU, D. Isolation and characterization of a seed-specific isoform of microsomal omega-6 fatty acid desaturase gene (FAD2-1B) from soybean. **DNA Sequence**, v. 19, p. 28–36, 2008.

- LIBAULT, M.; THIBIVILLIERS, S.; BILGIN, D. D.; RADWAN, O.; BENITEZ, M.; CLOUGH, S.J.; STACEY, G. Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. **The plant genome**, v.1, p.44-54, 2008.
- LIVAK K. J., SCHMITTGEN T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. **Methods**, v. 25, p.402-408, 2001.
- OLIVA, M. L.; SHANNON, J. G.; SLEPER, D. A.; ELLERSIECK, M. R.; CARDINAL, A. J.; PARIS, R. L.; LEE, J. D. Stability of fatty acid profile in soybean genotypes with modified seed oil composition. **Crop Science**, v. 46, p. 2069–2075, 2006.
- PFAFFL, M.W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C., e NEUVIANS, T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pairwise correlations. **Biotechnology Letters**, v.26, p. 509-515, 2004.
- RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, A. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 261–268, 2009.
- REN, C.; BILYEY, K. D.; BAUSELINCK, P. R. Composition, vigor, and proteome of mature soybean seeds developed under high temperature. **Crop Science**, v. 49, p. 1010-1022, 2009.
- SCHLUETER, J. A.; VASYLENKO-SANDERS, I. F.; DESHPANDE, S.; YI, J.; SIEGFRIED, M.; ROE, B. A.; SCHLUETER, S. D.; SCHEFFLER, B. E.; SHOEMAKER, R. C. The FAD2 Gene Family of Soybean: Insights into the Structural and Functional Divergence of a Paleopolyploid. **Genome The Plant Genome [A Supplement to Crop Science]**, n° 1, January 2007.
- TANG, G. Q.; NOVITZKY, W. P. ; GRIFFIN, H. C.; HUBER, S. C.; DEWEY, R. E. Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation. **The Plant Journal**, v. 44, p. 433–446, 2005.
- THOMAS, J.M.G.; BOOTE, K.J.; ALLEN, L.H. GALLO-MEAGHER, M.; DAVIS, J.M. Elevated temperature and carbon dioxide effects on soybean seed composition and transcript abundance. **Crop Science**, v. 43, p. 1548–1557, 2003.

- WILLEMS, E.; LEYNS, L.; VANDESOMPELE, J. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. **Analytical Biochemistry**, v. 379, p. 127–129, 2008.
- WILLIAM, D.H.; THOMAS, J. C.; BOOTH, J. R.; ANTHONY, J. K.; KEVIN, L.S.; NARENDRA, S.Y.; Cloning of a higher-plant plastid ω -6 fatty acid desaturase cDNA and its expression in a cyanobacterium. **Plant Physiology**, v. 105, p. 635–641, 1994.
- WILSON, R. F. **Seed composition**. p. 521–677. *In* H.R. Boerma and J.E. Specht (ed.) Soybeans: Improvement, production, and uses. 3rd ed. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. 2004.
- YADAV, N. S. Genetic modification of soybean oil quality. *In*: Verma, D. P. S.; Shoemaker, R. C. (Eds.). **Soybean genetics, molecular biology and biotechnology**. USA: CAB INTERNATIONAL, WALLINGFORD, CT, p. 127-188, 1996.
- WANG, L.; MA, H.; SONG, L.; SHU, Y.; GU, W. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress. **Journal of Proteomics**, v. 75, p 2109-2127, 2012.

**Capítulo II – Avaliação do efeito da substituição alélica das ω -3-
dessaturases de ácidos graxos insaturados em soja com base em
marcadores SNPs**

1 Resumo

Devido à alta instabilidade oxidativa do ácido linolênico ($18:3\Delta^{3,6,9}$), existe um grande interesse no desenvolvimento de genótipos superiores de soja que apresentem reduzidos teores desse ácido graxo. A síntese do ácido linolênico é catalisada por ω -3-dessaturases, tendo o ácido linoléico como substrato. Três genes (FAD3A, FAD3B e FAD3C) vem sendo descritos como os principais responsáveis pela expressão das ω -3-dessaturases em sementes de soja. A seleção assistida por marcadores moleculares para esses três genes pode otimizar o processo de obtenção de genótipos superiores. Assim, o principal objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da substituição alélica das ω -3-dessaturases de ácidos graxos insaturados em soja com base em marcadores SNPs, para validar a associação de marcadores moleculares para os genes FAD3A, FAD3B e FAD3C com o conteúdo de ácido linolênico. Foram genotipadas 185 progênies F_2 derivadas do cruzamento entre A29 (mutante para os três genes FAD, 1% de $18:3\Delta^{3,6,9}$) e Tucunaré (genótipo selvagem, 11% de $18:3\Delta^{3,6,9}$). Os resultados demonstram que os marcadores moleculares para os genes FAD3A, FAD3B e FAD3C foram eficientes no monitoramento do conteúdo de ácido linolênico nas populações segregantes F_2 e $F_{2:3}$. Além disso, as substituições dos alelos no loco FAD3A proporcionam maiores variações no conteúdo de ácido linolênico que as substituições nos outros dois locos. A partir desses dados, espera-se que seja possível introduzir os alelos recessivos dos genes FAD3A, FAD3B e FAD3C da linhagem A29 em genótipos elites do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja (PMQS) do BIOAGRO/UFV e desenvolver linhagens de soja especiais para a agroindústria apresentando baixos teores do ácido linolênico.

2 Introdução

As propriedades físico-químicas e biológicas do óleo são diretamente afetadas pela sua composição de ácidos graxos. A grande diversificação na utilização do óleo de soja tem demandado o desenvolvimento de genótipos com composição modificada de ácidos graxos, mais apropriada para o desenvolvimento de cada tipo de produto. Especificamente para óleos destinados a frituras e à produção de biodiesel existe grande interesse no aumento do teor de ácido oléico e redução nos teores dos ácidos linoléico e

linolênico, visando principalmente o aumento da sua estabilidade oxidativa (Costa Neto *et al.*, 2000; Farhoosh *et al.*, 2009; Gerde *et al.*, 2007; Knothe, 2007; Ramos *et al.*, 2009).

A composição final de ácidos graxos é influenciada pelo ambiente, por fatores genéticos e pela interação entre eles. Vários fatores têm sido citados como indutores de alterações no processo de biossíntese de lipídeos, dentre os quais se destaca a temperatura de cultivo durante o enchimento das vagens. O aumento da temperatura de cultivo da soja, normalmente provoca o aumento no conteúdo do ácido oléico e redução nos conteúdos dos ácidos linoléico e linolênico (Oliva *et al.*, 2006). Devido ao efeito ambiental, a seleção para baixo conteúdo de ácido linolênico baseada apenas em dados fenotípicos não tem se mostrado eficiente nos diferentes programas de melhoramento de soja (Wilson, 2004).

Os genes FAD3A (Glyma14g37350), FAD3B (Glyma02g39230) e FAD3C (Glyma18g06950), que codificam ω -3-dessaturases, afetam diretamente o acúmulo de ácido linolênico em sementes de soja. A utilização de marcadores moleculares associados a esses genes têm se mostrado promissora na seleção de genótipos superiores com reduzidos teores desse ácido graxo (Bilyeu *et al.*, 2005 ; Bilyeu *et al.*, 2006).

Genótipos mutantes que possuem baixos teores de ácido linolênico já tiveram os alelos do gene FAD3A bem caracterizados, o que tem permitido o desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo SNP (*Single-Nucleotide Polymorphism*). A PI361088B (3,8% de 18:3 $\Delta^{3,6,9}$) possui uma inserção de dois resíduos de timidina na posição 310, promovendo mudança do quadro de leitura e conseqüentemente o surgimento de um códon de parada prematuro na posição 328. A mutação em M5 (3,3% de 18:3 $\Delta^{3,6,9}$) é similar a de PI3661088B, apresentando também uma mudança no quadro de leitura, no entanto, neste caso ocorre uma deleção de 19 nucleotídeos na posição 1057, resultando em uma proteína com 25 resíduos de aminoácidos a mais na extremidade C-terminal. CX1512-44 (3% de 18:3 $\Delta^{3,6,9}$) apresenta uma mutação de apenas um par de nucleotídeos na posição 811, exatamente no sítio de *splicing*, o que leva à formação de uma proteína com estrutura alterada. C1640 (3,7% de 18:3 $\Delta^{3,6,9}$) também contém uma mutação de troca de bases, mas esta encontra-se na região codificadora, o códon para triptofano (TGG) no éxon 6 é modificado para um códon de parada (TGA) (Champpell & Bilyeu, 2007). No genótipo A29 (1% de 18:3 $\Delta^{3,6,9}$) foi possível o desenvolvimento de

marcadores moleculares do tipo SNPs para os alelos dos três genes, GmFAD3A, GmFAD3B e GmFAD3C (Bilyeu *et al.*, 2006).

O Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja (PMQS) do BIOAGRO/UFV vem desenvolvendo linhagens de soja especiais para a agroindústria, dentre as quais estão linhagens com baixos teores de ácidos linoléico e linolênico. Dentro desse contexto, uma das principais metas deste programa é aumentar a estabilidade oxidativa do óleo pela redução do conteúdo de ácido linolênico e pelo aumento do conteúdo do ácido oléico. O presente trabalho está inserido no PMQS e tem como objetivo geral avaliar o efeito da substituição alélica das ω -3-dessaturases de ácidos graxos insaturados em soja com base em marcadores SNPs, para validar a associação de marcadores moleculares para os genes FAD3A, FAD3B e FAD3C com o conteúdo de ácido linolênico.

3 Material e métodos

3.1 Material genético

Foram utilizados os genótipos A29 e Tucunaré, e populações segregantes derivadas do cruzamento entre A29 e Tucunaré. A variedade Tucunaré, desenvolvida pela Fundação Matogrosso, é amplamente cultivada no centro-oeste do Brasil, apresentando um elevado teor de óleo e aproximadamente 11% de ácido linolênico. O genótipo A29 foi desenvolvido por pesquisadores da Universidade Estadual de Iowa (EUA), possui apenas 1% de ácido linolênico e foi utilizado como fonte doadora de genes para baixos teores de ácido linolênico. O genótipo A29 foi obtido combinando três mutações independentes: *fan* da linhagem A5, *fan2* da linhagem A23 e *fan3* de uma linhagem A89-144003 (Bilyeu *et al.*, 2006). Para a obtenção das populações segregantes, inicialmente foram efetuados cruzamentos entre A29 x Tucunaré, obtendo-se sementes F₁. O híbrido foi autofecundado para obter as 185 progênes F₂, esse material foi novamente autofecundado obtendo-se a população F_{2,3}.

3.2 Determinação do conteúdo de ácido linolênico

As extrações dos ácidos graxos presentes na fração óleo dos grãos de soja e sua derivatização a metil-ésteres de ácidos graxos foram realizadas seguindo metodologia descrita por Jham *et al.* (1982). Foi determinado o conteúdo de ácido linolênico nas

variedades A29 e Tucunaré e nos indivíduos das populações segregantes nas gerações F₂ e F_{2:3}.

3.3 Extração de DNA

Foram extraídos DNA dos genótipos A29 e Tucunaré, e de 185 indivíduos da população F₂. O DNA de folha foi extraído pelo protocolo descrito por Doyle & Doyle (1990).

3.4 Genotipagem

A genotipagem foi realizada seguindo os procedimentos descritos por Bilyeu *et al.* (2005). Os *primers* utilizados para amplificação de segmentos dos genes FAD3A, FAD3B e FAD3C estão mostrados na Tabela 1. As reações de amplificação com *primers* específicos foram realizadas em um volume total de 25µl contendo: 30ng de DNA genômico; 1U de Taq DNA polimerase; Tris-HCl 10 mM (pH 8,0); KCl 50mM; Triton X-100 0,4%; 100µM de cada um dos desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs); MgCl₂ 2mM e 0,5µM dos *primers* específicos.

Tabela 1: *Primers* utilizados para a amplificação dos genes FAD3A, FAD3B e FAD3C

Gene	<i>Primer</i>	Sequência	Natureza
FAD3A	<i>Foward</i>	5' TTGCATCACCATGGTCATCAT 3'	Dominante
	<i>Reverse</i>	5' AGCTATTATCTAGCATTAAACCTCA 3'	
FAD3B	<i>Foward</i>	5' AGCCACAGAACTCACCATCAA 3'	Co-dominante
	<i>Reverse</i>	5' TGGCACAGTGAATCTAATG 3'	
FAD3C	<i>Foward</i>	5' TTGGATCAACAACATTCACCA 3'	Co-dominante
	<i>Reverse</i>	5' CATCACATGTTTGTGGTCTTGA 3'	

As reações de PCR foram conduzidas utilizando 30 ciclos, cada um constituído da seguinte seqüência: 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C e 30 s a 72 °C. Após os 30 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72 °C e, finalmente, a temperatura foi reduzida a 4 °C.

Os produtos de amplificação contidos em 10 µl de cada reação para os genes FAD3B e FAD3C foram clivados com enzimas de restrições para evidenciar o polimorfismo do SNP. Para o gene FAD3B foi utilizada a enzima *HpaI* (2,5 U) e para o gene FAD3C foi utilizada a enzima *BccI* (5 U).

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida a 10% durante 4h a 120 V. Para a obtenção das imagens,

os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,2 mg/mL), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados com o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (STRATAGENE).

3.5 Análises estatísticas

Para a realização das análises estatísticas de teste de χ^2 e teste t empregou-se o programa GENES (Cruz, 1997).

4 Resultados e discussão

Os valores médios da composição de ácido linolênico nos genótipos A29 e Tucunaré, e das populações segregantes F_2 e $F_{2:3}$ do cruzamento A29 x Tucunaré são apresentados na Tabela 2. Pode-se observar que as populações F_2 e $F_{2:3}$ apresentaram uma grande variação no conteúdo deste ácido graxo sendo observados valores entre 0,97 - 7,95% e 1,24 - 11,95%, respectivamente.

Tabela 2: Valores de média (X), desvio padrão (DP), mínimo (MIN), máximo (MAX), para teores de ácido linolênico de A29, Tucunaré e das populações segregantes F_2 e $F_{2:3}$ do cruzamento A29 x Tucunaré.

	A29	Tucunaré	F_2 AT	$F_{2:3}$ AT
X (%)	1,19	11,41	3,95	5,61
DP	0,17	0,35	1,39	2,42
MIN (%)	0,90	10,91	0,97	1,24
MAX (%)	1,84	12,17	7,95	11,95

O genótipo IA3017 possui as mesmas mutações para os genes FAD3A, FAD3B e FAD3C que o genótipo A29, conferindo conteúdo de ácido linolênico de aproximadamente 1%. O conteúdo de ácido linolênico na população segregante BC_1F_2 derivada do retrocruzamento com o genótipo SS97-6946 (possui aproximadamente 8% de ácido linolênico) apresentou variação de 1 a 10% (Bilyeu *et al.*, 2006), similar ao encontrado em nosso estudo com as populações segregantes F_2 e $F_{2:3}$ derivadas do cruzamento entre A29 x Tucunaré.

Bilyeu *et al.* (2003) caracterizaram os três genes FAD3A, FAD3B e FAD3C responsáveis pela conteúdo de ácido linolênico em sementes de soja. No gene FAD3A da linhagem A5 foi identificada uma deleção que permitia a diferenciação do alelo

mutante frente aos alelos normais. Os SNPs nos genes FAD3B e FAD3C de A29 foram posteriormente caracterizadas por Bilyeu *et al.* (2006), permitindo o desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo PCR-RFLP específicos para os alelos de A29.

Os perfis polimórficos para os genes FAD3A e FAD3B nos genótipos A29, Tucunaré, F₁ e na população F₂ são apresentados na Figura 1. O princípio da genotipagem para o gene FAD3C é o mesmo apresentado para o gene FAD3B. O marcador para o gene FAD3A é dominante, não permitindo diferenciar as classes genotípicas AA e Aa. Já os marcadores para o gene FAD3B e FAD3C são co-dominantes, permitindo a identificação das três classes genotípicas.

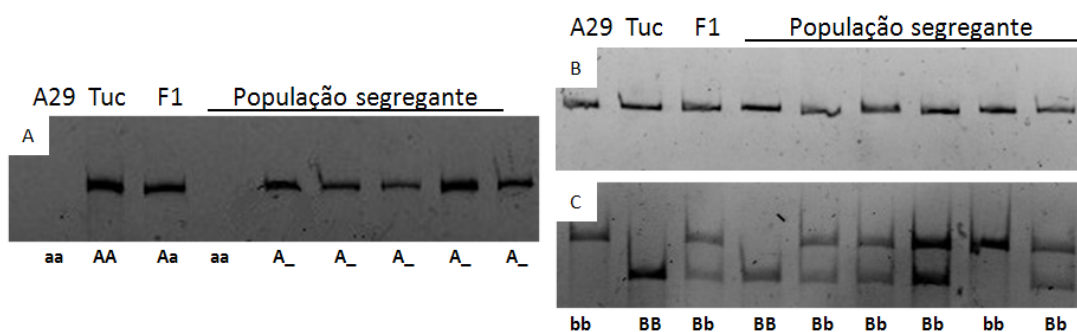


Figura 1: Genotipagem dos indivíduos utilizando os marcadores moleculares para os genes FAD3A e FAD3B nos genótipos A29, Tucunaré (Tuc), F₁ e em plantas da população segregante F₂. 1A – Padrão polimórfico obtido pela amplificação do gene FAD3A. 1B – Produto de amplificação do gene FAD3B. 1C – Padrão polimórfico obtido a partir da reação de clivagem do produto de amplificação do gene FAD3B.

A segregação dos marcadores moleculares dos genes FAD3A, FAD3B e FAD3C na população F₂ do cruzamento entre A29 e Tucunaré seguiu o padrão esperado de segregação (Tabela 3). O marcador FAD3A que é dominante apresentou segregação 3:1 e os marcadores co-dominantes FAD3B e FAD3C apresentaram padrão de segregação na razão de 1:2:1.

Tabela 3: Segregação dos marcadores moleculares dos genes FAD3A, FAD3B e FAD3C na população F₂ derivada do cruzamento entre A29 x Tucunaré.

Marcador	Classe genotípica				Hipótese	χ^2	Probabilidade
	AA	Aa	Aa	A ₋			
FAD3A			53	132	3:1	1,313	25,175 ^{ns}
FAD3B	47	100	38		1:2:1	2,092	31,1359 ^{ns}
FAD3C	39	91	55		1:2:1	2,816	24,4606 ^{ns}

^{ns} não significativo pelo teste χ^2 a 5% de probabilidade

A associação do conteúdo de ácido linolênico em F₂ e F_{2:3} com os diferentes genótipos na população segregante derivada do cruzamento entre A29 e Tucunaré é apresentada na Figura 2. Pode-se observar que os indivíduos com menor conteúdo de ácido linolênico apresentam predominância de alelos recessivos, enquanto que os indivíduos com maior conteúdo de ácido linolênico apresentam predominância de alelos dominantes para os genes FAD3A, FAD3B e FAD3C.

Na população F₂ derivada do cruzamento entre A29 e Tucunaré foram identificados três indivíduos triplo recessivo para os genes FAD3A, FAD3B e FAD3C. Esses indivíduos apresentaram os menores valores de ácidos linolênico na geração F₂ (0,97; 1,09 e 1,13%) e F_{2:3} (1,34; 1,24 e 1,24%). Já para o genótipo que apresenta homozigose para os alelos dominantes de FAD3B e FAD3C e pelo menos uma forma do alelo dominante de FAD3A foram observados 7 indivíduos. O conteúdo de ácido linolênico nesse genótipo variou de 5,09 a 7,96% na geração F₂ e 8,07 a 11,95% na geração F_{2:3}. A maior variação no conteúdo de ácido linolênico nesse tipo de genótipo possivelmente se deve a dualidade para o gene FAD3A, podendo esse ser homozigoto dominante ou heterozigoto.

Resultados semelhantes foram observados por Bilyeu *et al.* (2006) avaliando a população segregante BC₁F₂ SS97-6946 x (SS97-6946 x IA3017). Nesse estudo foram avaliados apenas 63 indivíduos e encontrado apenas um genótipo que apresentava as três formas recessivas para os genes FAD3A, FAD3B e FAD3C. Esse indivíduo apresentou o menor conteúdo de ácido linolênico, aproximadamente 1%. Já para as formas alélicas dominantes foram observados 4 indivíduos tendo o teor de ácido linolênico variando entre 6,3 e 9,2%.

Populações contendo outros alelos para os genes FAD3A e FAD3C também relataram a associação entre as formas recessivas e o baixo conteúdo de ácido linolênico. Bilyeu *et al.* (2005) estudaram a população F₂ derivada do cruzamento entre

Williams 82 x 2721. A linhagem 2721 apresenta conteúdo médio de ácido linolênico de aproximadamente 3%. Essa linhagem é derivada de CX1512-44 e apresenta modificações para os genes FAD3A, FAD3B e FAD3C, porém a modificação no gene FAD3B não provoca alterações na funcionalidade da ω -3-dessaturase. A partir da análise de associação dos genes FAD3A e FAD3C em 107 indivíduos F₂ foi possível identificar 7 indivíduos homocigotos dominantes apresentando 9% de conteúdo médio de ácido linolênico e 15 indivíduos duplo recessivos apresentando 3% de conteúdo médio de ácido linolênico.

Com isso fica evidente que a fixação de alelos mutantes para os genes FAD3A, FAD3B e FAD3C pode provocar a redução do conteúdo de ácido linolênico em diferentes genótipos de soja.

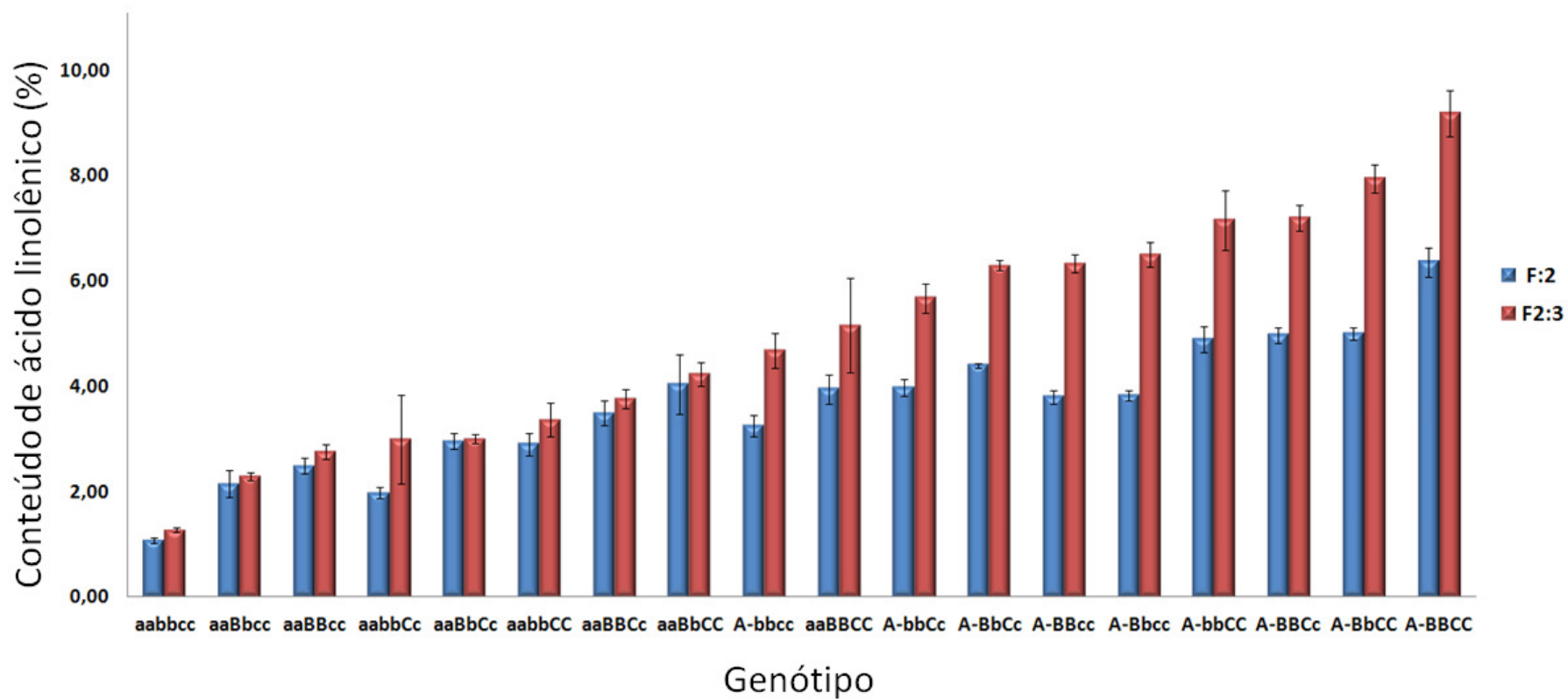


Figura 2: Conteúdo médio de ácido linolênico nos diferentes genótipos dos indivíduos derivados da população F₂ e F_{2:3} do cruzamento entre A29 x Tucunaré. As barras representam o erro padrão da média.

Pela análise preliminar da Figura 2 é possível evidenciar que os genes FAD3A, FAD3B e FAD3C contribuem de forma aditiva e tendo efeito diferenciado no conteúdo de ácido linolênico. O efeito médio da substituição gênica dos alelos de FAD3A, FAD3B e FAD3C no conteúdo de ácido linolênico avaliado na população derivada do cruzamento entre A29 x Tucunaré em F₂/F_{2,3}, são apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6, respectivamente.

Tabela 4: Efeito médio da substituição alélica do gene FAD3A no conteúdo de ácido linolênico avaliado na população derivada do cruzamento entre A29 x Tucunaré em F₂/F_{2,3}.

	CC	Cc	cc
	A ₋ →aa	A ₋ →aa	A ₋ →aa
BB	2,41 [*] /4,03 ^{**}	1,48 [*] /3,43 ^{**}	1,30 ^{**} /3,58 ^{**}
Bb	0,95 ^{ns} /3,71 ^{**}	1,44 ^{**} /3,29 ^{**}	1,68 ^{**} /4,22 ^{**}
bb	2,00 ^{**} /3,80 ^{**}	1,99 ^{**} /2,68 [*]	2,18 ^{**} /3,41 ^{**}

*significativo pelo teste t a 5% de probabilidade

**significativo pelo teste t a 1% de probabilidade

^{ns}não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade

Verificando a Figura 2, Tabela 4, Tabela 5 e Tabela 6 é possível inferir que as substituições gênicas dos alelos em FAD3A proporcionam maiores variações no conteúdo de ácido linolênico que as substituições alélicas nos demais genes. O gene FAD3B é o que aparentemente leva a menor variação no conteúdo de ácido linolênico quando suas formas alélicas são alteradas.

Esses resultados de associação são condizentes aos encontrados em outras populações como a BC₁F₂ SS97-6946 x (SS97-6946 x IA3017) de Bilyeu *et al.* (2006) e a F₂ de Williams 82 x 2721 de Bilyeu *et al.* (2005). Eles dão suporte ao modelo que os genes FAD3A, FAD3B e FAD3C contribuem para o conteúdo total de ácido linolênico na semente. Além disso, as mutações no gene FAD3A provocam maior efeito na variação do conteúdo de ácido linolênico que as mutações observadas nos outros genes (Bilyeu *et al.*, 2003; Bilyeu *et al.*, 2005 e Bilyeu *et al.*, 2006).

Tabela 5: Efeito médio da substituição alélica do gene FAD3B no conteúdo de ácido linolênico avaliado na população derivada do cruzamento entre A29 x Tucunaré em F₂/F_{2:3}.

	CC			Cc			cc		
	BB→bb	BB→Bb	Bb→bb	BB→bb	BB→Bb	Bb→bb	BB→bb	BB→Bb	Bb→bb
A ₋	1,46 [*] /2,02 [*]	1,36 ^{**} /1,24 ^{ns}	0,10 ^{ns} /0,79 ^{ns}	1,00 [*] /1,51 ^{ns}	0,57 ^{ns} /0,90 ^{ns}	0,42 ^{ns} /0,62 ^{ns}	0,55 ^{ns} /1,65 [*]	-0,03 ^{ns} /-0,17 ^{ns}	0,58 ^{ns} /1,82 [*]
aa	1,05 [*] /1,79 [*]	-0,10 ^{ns} /0,91 ^{ns}	1,15 ^{ns} /0,88 ^{ns}	1,51 ^{**} /0,77 ^{ns}	0,53 ^{ns} /0,77 [*]	0,98 ^{**} /0,01 ^{ns}	1,43 ^{**} /1,48 ^{**}	0,34 ^{ns} /0,47 ^{ns}	1,08 [*] /1,01 ^{**}

*significativo pelo teste t a 5% de probabilidade

**significativo pelo teste t a 1% de probabilidade

^{ns} não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade

Tabela 6: Efeito médio da substituição alélica do gene FAD3C no conteúdo de ácido linolênico avaliado na população derivada do cruzamento entre A29 x Tucunaré em F₂/F_{2:3}.

	BB			Bb			bb		
	CC→cc	CC→Cc	Cc→cc	CC→cc	CC→Cc	Cc→cc	CC→cc	CC→Cc	Cc→cc
A ₋	2,56 ^{**} /2,85 ^{**}	1,39 [*] /1,99 [*]	1,18 ^{**} /0,86 ^{ns}	1,17 ^{**} /1,44 [*]	0,60 [*] /1,66 ^{**}	0,57 [*] /-0,21 ^{ns}	1,65 ^{**} /2,48 [*]	0,92 [*] /1,49 ^{ns}	0,73 ^{ns} /0,99 ^{ns}
aa	1,46 ^{**} /2,39 [*]	0,46 ^{ns} /1,39 [*]	1,00 ^{ns} /1,01 [*]	1,90 [*] /1,95 ^{**}	1,09 ^{ns} /1,24 ^{**}	0,81 ^{ns} /0,72 ^{**}	1,83 ^{**} /2,09 ^{**}	0,92 [*] /0,37 ^{ns}	0,92 ^{**} /1,72 ^{ns}

*significativo pelo teste t a 5% de probabilidade

**significativo pelo teste t a 1% de probabilidade

^{ns} não significativo pelo teste t a 5% de probabilidade

5 Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- Os marcadores moleculares para os genes FAD3A, FAD3B e FAD3C foram eficientes na monitoração do conteúdo de ácido linolênico na população F₂ segregante derivadas do cruzamento entre A29 e Tucunaré;
- A fixação de alelos mutantes para os genes FAD3A, FAD3B e FAD3C pode provocar a redução do conteúdo de ácido linolênico em diferentes genótipos de soja;
- As substituições dos alelos do gene FAD3A proporcionam maiores variações no conteúdo de ácido linolênico que as substituições alélicas nos demais genes.

6 Perspectivas

A partir das análises aqui apresentadas é possível verificar que o conteúdo de ácido linolênico de variedades adaptadas às regiões brasileiras pode ser manipulado de acordo com a combinação dos diferentes alelos de FAD3A, FAD3B e FAD3C. Com a validação da associação dos marcadores moleculares para os alelos desses três genes no genótipo A29 com o baixo conteúdo de ácido linolênico, espera-se que seja possível introduzi-los em genótipos elites do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja (PMQS) do BIOAGRO/UFV com o objetivo de desenvolver linhagens de soja especiais para a agroindústria apresentando reduzido teor de ácido linolênico.

7 Referências bibliográficas

- BILYEU, K. D.; PALAVALLI, L.; SLEPER, D. A.; BEUSELINCK, P. R. Three microsomal omega-3 fatty-acid desaturase genes contribute to soybean linolenic acid levels. **Crop Science**, v. 43, p.1833–1838, 2003.
- BILYEU, K. D.; PALAVALLI, L.; SLEPER, D. A.; BEUSELINCK, P. R. Molecular genetic resources for development of 1% linolenic acid soybeans. **Crop Science**, v. 46, p.1913–1918, 2006.
- BILYEU, K. D.; PALAVALLI, L.; SLEPER, D. A.; BEUSELINCK, P. R. Mutations in Soybean microsomal omega-3 fatty acid desaturase genes reduce linolenic acid concentration in soybean seeds. **Crop Science**, v. 45, p.1830-1836, 2005.
- CHAPPELL, A. S.; BILYEU, K. D. The low linolenic acid soybean line pi 361088b contains a novel gmfad3a mutation. **Crop Science**, v. 47, p. 1705-1710, 2007.
- COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F. The utilization of used frying oil for the production of biodiesel. **Química Nova**, v. 23, p. 531-537, 2000.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa, MG. 442p. 1997.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.
- FARHOOSH, R.; EINAFSHAR, S.; SHARAYEI, P. The effect of commercial refining steps on the rancidity measures of soybean and canola oils. **Food Chemistry**, v. 115, p. 933–938, 2009.
- GERDE, J.; HARDY, C.; FEHR, W.; WHITE, P. J. Frying Performance of No-trans, Low-Linolenic Acid Soybean Oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 557-563, 2007.
- JHAM, G. N.; TELLES, F. F. F.; CAMPOS, L. G. Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 59, p. 132-133, 1982.
- KNOTHE, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Processing Technology**, v. 88, p. 669-677, 2007.
- OLIVA, M. L.; SHANNON, J. G.; SLEPER, D. A.; ELLERSIECK, M. R.;

CARDINAL, A. J.; PARIS, R. L.; LEE, J. D. Stability of fatty acid profile in soybean genotypes with modified seed oil composition. **Crop Science**, v. 46, p. 2069–2075, 2006.

RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, A. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 261–268, 2009.

WILSON, R.F. **Seed composition**. p. 521–677. *In* H.R. Boerma and J.E. Specht (ed.) Soybeans: Improvement, production, and uses. 3rd ed. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. 2004.