

LORÊTA BUUDA DA MATTA

**MELHORAMENTO GENÉTICO DA SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill) PARA
BAIXO TEOR DE ÁCIDO LINOLÊNICO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

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

T

M435m
2008

Matta, Lorêta Buuda da, 1981-
Melhoramento genético da soja (*Glycine max* (L.)
Merrill) para baixo teor de ácido linolênico / Lorêta
Buuda da Matta. – Viçosa, MG, 2008.
x, 58f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maurilio Alves Moreira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 51-58.

1. Soja - Melhoramento genético. 2. Soja - Teor de
ácido linolênico. 3. Soja - Teor de óleo. 4. Soja -
Qualidade. 5. Soja - Teor de ácidos graxos. 6. Herda-
bilidade. 7. Ganho genético. 8. Marcadores genéticos.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 635.6553

LORÊTA BUUDA DA MATTA

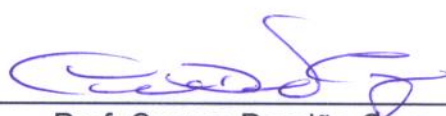
**MELHORAMENTO GENÉTICO DA SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill)
PARA BAIXO TEOR DE ÁCIDO LINOLÊNICO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2008.



Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Co-Orientador)



Prof. Cosme Damião Cruz
(Co-Orientador)



Prof^a Marcia Flores da Silva



Prof. Adésio Ferreira



Prof. Maurilio Alves Moreira
(Orientador)

*O SENHOR é o meu pastor; nada me faltará.
Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranqüilas.
Refrigera a minha alma;
guia-me pelas veredas da justiça por amor do seu nome.
Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum,
porque tu estás comigo; a tua vara e teu cajado me consolam.
Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges a
minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda.
Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da
minha vida; e habitarei na casa do Senhor por longos dias.*

Salmo 23:1-6

A Deus.

À minha mãe, Jana Maruska Buuda da Matta.

Ao meu pai, Lauro Alves da Matta Júnior.

As minhas irmãs Ingrid e Karina e minhas sobrinhas.

Ao meu noivo Frederico Araújo de Almeida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar e preencher os meus caminhos e dar-me forças para vencer mais essa etapa da minha vida.

Aos professores da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pela amizade, carinho, incentivo, por todos os conhecimentos que foram transmitidos ao longo da minha graduação, tendo contribuído diretamente com minha formação profissional, tornando possível a realização do curso de mestrado.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de pós-graduação de Fitotecnia pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

À COODETEC pelo material genético e apoio financeiro.

À CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Maurilio Alves Moreira, pela oportunidade, competente orientação, apoio, amizade e pelo exemplo de dedicação a UFV e pela eficiência no planejamento e na sugestão da pesquisa científica.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela extrema paciência, disponibilidade, ensinamentos, amizade, colaboração e pelo seu exemplo de profissionalismo.

Ao Professor Cosme Damião Cruz pelas sugestões nas análises estatísticas e discussão dos resultados, amizade, incentivo, disposição em ajudar e pelo exemplo de competência e simplicidade.

Ao amigo Newton Deniz Piovesan, por ter me apoiado durante todo o curso de mestrado, pela paciência, conselhos e amizade. Por ter transmitido seus conhecimentos sem medir esforços, pelos ensinamentos, críticas e sugestões que foram fundamentais para minha formação e sem você não seria possível a realização deste trabalho.

Ao amigo Pedro Ivo Good God pelo apoio, amizade, conselhos, atenção e ensinamentos indispensáveis para minha formação e para realização deste trabalho.

À Professora Marcia Flores da Silva pelos ensinamentos, paciência, dedicação, amizade e por ter me ajudado muito no laboratório.

Ao Professor Adésio Ferreira, pela amizade, por todos os ensinamentos e por ter ajudado na execução de toda a estatística deste trabalho.

Aos funcionários Sandra, Gláucia, Naldo, José Carlos, Marcos (*in memoriam*), Cupertino e Cássio, pela ajuda e colaboração na realização deste trabalho.

A estagiária Gabriela, pela amizade, dedicação e toda a contribuição na realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório: Marcão, Josiane, Janaína, Valéria, Suelen, Julierme, Leandro, Marcelo, Demerson, Klever, Márcia Costa, Rafael, Bruno, Dodora, Marta e Thiago pela ajuda, amizade e agradável convivência.

A minha amiga Fernanda, pelo carinho, amizade, incentivo e por estar sempre disposta a me ajudar. Passamos momentos difíceis e que sem o seu apoio não superaria tais obstáculos. Por ter sido muito mais que uma colega de laboratório e ter se tornado uma grande amiga para vida toda.

Aos meus pais Jana e Lauro, pelo amor incondicional, apoio, incentivo e, sobretudo pelos valores que me foram ensinados e que são responsáveis por todas as minhas conquistas.

As minhas irmãs Ingrid e Karina, pelo incentivo, amor imensurável, compreensão e força a todo instante. Minhas sobrinhas Nicole, Giovanna e Giulia por seus sorrisos e brincadeiras que alegram minha vida.

Ao meu noivo Frederico, por todo o amor, companheirismo, incentivo e compreensão, que apesar da distância, sempre esteve presente ao meu lado dando-me força e coragem para vencer mais essa etapa das nossas vidas.

A Marcelino (*in memoriam*), Solange, Américo, Simone, Anna Laura, Nino, Mequinho e Pepeu, por todo o apoio, incentivo, amizade e carinho que vocês me proporcionaram ao longo destes anos.

Ao meu amigo irmão Carlindo, por estar sempre ao meu lado me dando força, carinho e amizade desde a graduação, não medindo esforços para me ajudar e sempre me incentivando nessa nossa jornada.

A minha amiga Thaíse, que mesmo longe continua me apoiando e incentivando e me dando toda força e carinho em todas as horas.

As minhas amigas Zoraia e Rosana, pela amizade, companheirismo, conselhos e por alegrar meus dias em Viçosa.

A toda minha família e todos aqueles que estiveram direta ou indiretamente envolvidos nas vitórias que culminaram na realização deste sonho tão esperado.

BIOGRAFIA

Lorêta Buuda da Matta, filha de Lauro Alves da Matta Júnior e Jana Maruska Buuda da Matta, nasceu na cidade de Salvador, Bahia, em 28 de outubro de 1981.

Em outubro de 2001, iniciou o curso de graduação em Engenharia Agrônômica na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, graduando-se em agosto de 2006.

Em outubro de 2006, iniciou o curso de pós-graduação em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se aos exames finais de defesa de tese para obtenção do título de *Magister Scientiae*, no dia 25 de fevereiro de 2008.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Biossíntese de ácidos graxos	4
2.2. Composição e qualidade do óleo.....	6
2.3. Melhoramento da soja	8
2.3.1 Melhoramento genético para teores de ácidos graxos.....	10
2.3.2 Redução do ácido linolênico e herança genética	11
2.3.2 Herdabilidade e seleção	14
2.4. Divergência genética utilizando marcadores microssatélites.....	16
3. METODOLOGIA.....	19
3.1. Materiais genéticos e procedimentos experimentais	19
3.2. Análise dos teores de ácidos graxos	21
3.3. Extração de DNA.....	22
3.4. Quantificação do DNA.....	22
3.5. Condições de amplificação e eletroforese.....	23
3.6. Seleção de <i>primes</i> de microssatélites	23
3.7. Análises estatísticas.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5. CONCLUSÕES.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

RESUMO

MATTA, Lorêta Buuda da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Melhoramento genético da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) para baixo teor de ácido linolênico.** Orientador: Maurilio Alves Moreira. Co-orientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Cosme Damião Cruz.

A utilização do óleo de soja para fins industriais e nutricionais é definida pela composição dos ácidos graxos presentes nas sementes, que afetam diretamente as características físicas e químicas e o valor nutricional do óleo produzido. A redução do teor de ácido linolênico está associada com aumento da estabilidade oxidativa e melhoria do sabor do óleo. Este trabalho integra parte do programa de melhoramento para a qualidade da soja do BIOAGRO/UFV e teve como objetivo a obtenção de linhagens de soja produtivas, com baixo teor de ácido linolênico tendo como doador o acesso norte-americano A29. Para isso, foram realizadas as etapas de: (1) análise não destrutiva do teor de ácido linolênico de sementes em duas populações F_2 contrastantes para esta característica; (2) seleção das sementes com menor teor de ácido linolênico de cada cruzamento; (3) avaliação da variabilidade genética, herdabilidades, ganhos de seleção, predito e realizado, para teor de ácido linolênico nas duas populações F_2 estudadas; (4) realização de *fingerprinting* das plantas F_2 selecionadas com marcadores microssatélites; (5) confirmação do baixo teor de ácido linolênico nas sementes F_3 ; (6) determinação da divergência genética entre progenitores recorrentes e progenitores doadores de alelos que condicionam o baixo teor de ácido linolênico; (7) seleção de híbridos derivados de genótipos geneticamente mais similares às linhagens da COODETEC com auxílio de marcadores moleculares e que confirmaram a condição de baixo teor de ácido linolênico nas sementes F_3 . As duas populações F_2 apresentaram herdabilidades altas para teor de ácido linolênico sugerindo que são adequadas para a obtenção de ganhos para baixo teor de ácido linolênico, e que a seleção pode ser efetuada em gerações precoces. Somente a população F_2 do cruzamento entre A29 x Tucunaré apresentou herdabilidade acima de 50%, quando estimada por meio da regressão pai/filho. Apesar da população F_2 do cruzamento entre A29 x

Tucunaré ter apresentado maiores ganhos predito e realizado, devido à alta variabilidade genética desta população, os 30 indivíduos selecionados tinham teores de ácido linolênico abaixo de 2,5%. As diferentes condições ambientais em que foram conduzidas as populações F₂ e F₃ do cruzamento entre A29 x CS303TNKCA promoveram baixo ganho realizado. O estudo da divergência genética evidenciou que os progenitores são divergentes entre si, sendo o genótipo A29, doador de alelos para baixíssimos teores de linolênico, o mais divergente, entretanto, as linhagens da COODETEC foram bastante similares entre si devido à proximidade do *background* genético dessas linhagens. O *fingerprinting* de DNA possibilitou a identificação dos indivíduos mais similares em relação às linhagens da COODETEC. Foi possível selecionar, nas duas populações F₂ estudadas, quatro indivíduos mais próximos das linhagens da COODETEC e que confirmaram baixos teores de ácido linolênico na geração F₃.

ABSTRACT

MATTA, Lorêta Buuda da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2008. **Breeding (*Glycine max* (L.) Merrill) for low linolenic acid content in Soybean.** Advisor: Maurilio Alves Moreira. Co-advisors: Everaldo Gonçalves de Barros and Cosme Damião Cruz.

The use of the soybean oil for industrial and nutritional purposes is defined by the composition of the fatty acids present in the seeds, which directly affect the physical and chemical characteristics and the nutritional value of the oil produced. The reduction of the linolenic acid content is associated with the increase of the oxidative stability and the improvement of the oil taste. This work takes part in the soybean breeding program of the BIOAGRO/UFV and its objective was to achieve productive soybean lineages, with low content of linolenic acid, having as donator the American access A29. For such, the following stages were carried out: (1) non-destructive analysis of the linolenic content of seeds in two contrasting F_2 populations for this characteristic; (2) selection of seeds with lower contents of linolenic acid of each crossing; (3) evaluation of the genetic variability, heritabilities, selection gains, predicted and realized, for the content of linolenic acid in both F_2 populations studied; (4) performance of the *fingerprinting* of the F_2 plants selected with microsatellite markers; (5) confirmation of the low content of linolenic acid present in the F_3 seeds; (6) determination of the genetic divergence between recurrent parents and parents that are donators of alleles that condition the low content of linolenic acid; (7) selection, with the help of molecular markers, of hybrids derivative from genotypes which are genetically more similar to the lineages of the COODETEC, and which confirmed the linolenic acid low content condition in the F_3 seeds. Both F_2 populations presented high heritabilities for the linolenic acid content, suggesting that they are adequate for the achievement of gains for the low content of linolenic acid, and that the selection can be performed in precocious generations. Only the F_2 population of the A29 x Tucunaré crossing presented heritability higher than 50%, when estimated by parent-child regression. Although the F_2 population from the A29 x Tucunaré crossing presented higher predicted and realized gains, due to its high genetic

variability, the 30 individuals selected presented linolenic acid contents below 2,5%. The different environmental conditions in which the F₂ and F₃ populations from the A29 x CS303TNKCA crossing were carried out provided a low realized gain. The study on genetic divergence showed that the parents are different from one another, and the genotype A29, donator of alleles for very low linolenic contents, was the most divergent. However, the lineages from the COODETEC were very similar due to the genetic *background* proximity of such lineages. The DNA *fingerprinting* allowed the identification of the most similar individuals as to the COODETEC lineages. It was possible to select, in both F₂ populations studied, four individuals which are closer to the COODETEC lineages and that confirmed the low contents of linolenic acid in the F₃ generation.

1. INTRODUÇÃO

A soja é a mais importante leguminosa cultivada no mundo, sendo a principal *commodity* agrícola do Brasil. O país é o segundo maior produtor mundial de soja, e a cada ano vem crescendo a área cultivada levando a um conseqüente aumento de produção. O complexo soja, em 2007, teve um faturamento com as exportações de aproximadamente 10,18 bilhões de dólares (CONAB, 2007), destacando-se tanto por sua expressiva participação nas exportações sob a forma de farelo, óleo e grãos, como também no suprimento do mercado interno de óleos comestíveis e derivados protéicos.

A semente de soja contém, em média, 40% de proteínas, 21% de lipídios, 34% de carboidratos e 5% de minerais (BURTON, 1997). Os níveis de proteína variam de 32 a 44% e os óleos de 17 a 24% nas variedades comerciais (SEDIYAMA *et al.*, 1999). Devido ao alto teor de proteínas e lipídios, a soja é, atualmente, responsável por cerca de 60% do suprimento de proteína de origem vegetal e 30% do óleo consumido no mundo. Sendo que do óleo vegetal produzido no mundo 90% destina-se à alimentação humana, na forma de margarinas, gordura vegetal hidrogenada e óleos para saladas e frituras. Entretanto, novas perspectivas para maior utilização do óleo de soja na indústria, sob a forma de biodiesel, estão sendo consideradas.

O óleo de soja é constituído essencialmente de triacilgliceróis, que são ésteres formados a partir de três ácidos graxos e uma molécula de glicerol. Os ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0), oléico (18:1 Δ^9), linoléico (18:2 $\Delta^{9,12}$) e linolênico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$) são os principais ácidos graxos encontrados na fração óleo de soja. A qualidade do óleo é determinada pela composição e distribuição destes ácidos graxos na molécula de triacilglicerol, influenciando suas propriedades físicas e químicas, como o ponto de fusão e a estabilidade oxidativa.

Na fração óleo de sementes de soja, o ácido linoléico representa, em média, cerca de 57% da sua composição sendo encontrado em maior concentração em tecidos de reserva de sementes. Enquanto o ácido linolênico, que é o ácido graxo mais abundante na maioria dos tecidos de plantas,

apresenta teor relativo nas sementes que corresponde a apenas 7 a 9% da fração óleo (KITAMURA, 1984; HILDEBRAND, 1988).

O alto teor de ácidos graxos polinsaturados é responsável pela redução da estabilidade à oxidação e da qualidade do óleo de soja. E por essa composição não ser adequada aos diversos fins industriais, existe considerável interesse em modificá-la, por melhoramento tradicional ou pelo uso de novas técnicas de biologia molecular. A principal meta no melhoramento da qualidade do óleo de soja tem sido o aumento da sua estabilidade oxidativa, pela redução do teor de ácido linolênico e pelo aumento do teor de ácido oléico.

O melhoramento para a redução dos teores de ácido linolênico baseia-se, principalmente, na obtenção de genótipos mutantes, devido à pequena variabilidade genética encontrada para esta característica. Por meio de retrocruzamentos é possível transferir os alelos para baixo teor de ácido linolênico para cultivares de alto desempenho agrônômico. Marcadores moleculares são muito úteis em trabalhos de seleção, pois permitem construir padrões de *fingerprinting* nas progênies dos cruzamentos para seleção dos indivíduos geneticamente mais similares ao genitor recorrente. Essa técnica promove um melhor acompanhamento da introgressão de genes durante o processo de retrocruzamento reduzindo o tempo necessário para recuperação do progenitor recorrente.

Este trabalho integra parte do programa de melhoramento para a qualidade da soja do BIOAGRO/UFV e teve como objetivo a obtenção de linhagens de soja produtivas e com baixo teor de ácido linolênico. Para isso, foram realizadas as etapas de:

1. Análise do teor de ácido linolênico de sementes em duas populações F_2 contrastantes para esta característica por método não destrutivo;
2. Avaliação da variabilidade genética, herdabilidades, ganhos de seleção, predito e realizado, para teor de ácido linolênico nas duas populações F_2 estudadas;
3. Seleção das sementes com menor teor de ácido linolênico de cada cruzamento;
4. Realização de *fingerprinting* das plantas F_2 selecionadas com marcadores microssatélites;
5. Confirmação do baixo teor de ácido linolênico nas sementes F_3 ;

6. Determinação da divergência genética entre progenitores recorrentes e progenitores doadores de alelos que condicionam o baixo teor de ácido linolênico;

7. Seleção de híbridos derivados de genótipos geneticamente mais similares às linhagens da COODETEC com auxílio de marcadores moleculares e que confirmaram a condição de baixo teor de ácido linolênico nas sementes F₃.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biossíntese de ácidos graxos

A biossíntese de lipídios, em vegetais, envolve a biossíntese de ácidos graxos, a produção dos lipídios estruturais das membranas plastidiais, a síntese de triacilgliceróis e a produção dos lipídios estruturais das membranas extraplastidiais (MEKLEDOV *et al.*, 2000). As gorduras e os óleos existem principalmente na forma de triacilgliceróis que são as principais formas químicas de armazenamento de energia nas células, nos quais as moléculas de ácidos graxos são unidas por ligações ésteres aos três grupos hidroxilas do glicerol (NELSON e COX, 2002).

A biossíntese de ácidos graxos envolve a condensação cíclica de unidades de dois carbonos na qual o acetil-CoA é o precursor. Em plantas, os ácidos graxos são sintetizados quase exclusivamente nos plastídios. Nos cloroplastos, onde ocorre o início da síntese, o NADPH é disponibilizado para que ocorram as reduções necessárias à síntese e as cadeias de ácidos graxos que são alongadas até comprimentos de 16 a 18 átomos de carbono (YADAV, 1996). No retículo endoplasmático liso as cadeias de ácidos graxos são aumentadas, insaturadas ou processadas em reações adicionais, para a formação de triacilgliceróis ou fosfolipídios (MEKHEDOV *et al.*, 2000).

Acredita-se que as enzimas da rota são mantidas juntas em um complexo conhecido como ácido graxo sintetase (FAS). Este complexo provavelmente permite que a série de reações ocorra com maior eficiência (TAIZ e ZEIGER, 2004) e catalisam a formação de ácidos graxos a partir de acetil-CoA e malonil-CoA (YADAV, 1996).

A primeira etapa da rota é a síntese de malonil-CoA a partir de acetil-CoA e CO₂ pela enzima acetil-CoA carboxilase (Figura 1) (SASAKI *et al.*, 1995). A forte regulação da acetil-CoA carboxilase parece controlar a taxa global de síntese de ácidos graxos (OHLROGGE e JAWORSKI, 1997). O malonil-CoA, então, reage com a proteína carregadora de acil (ACP, do inglês *acyl carrier protein*) gerando malonil-ACP.

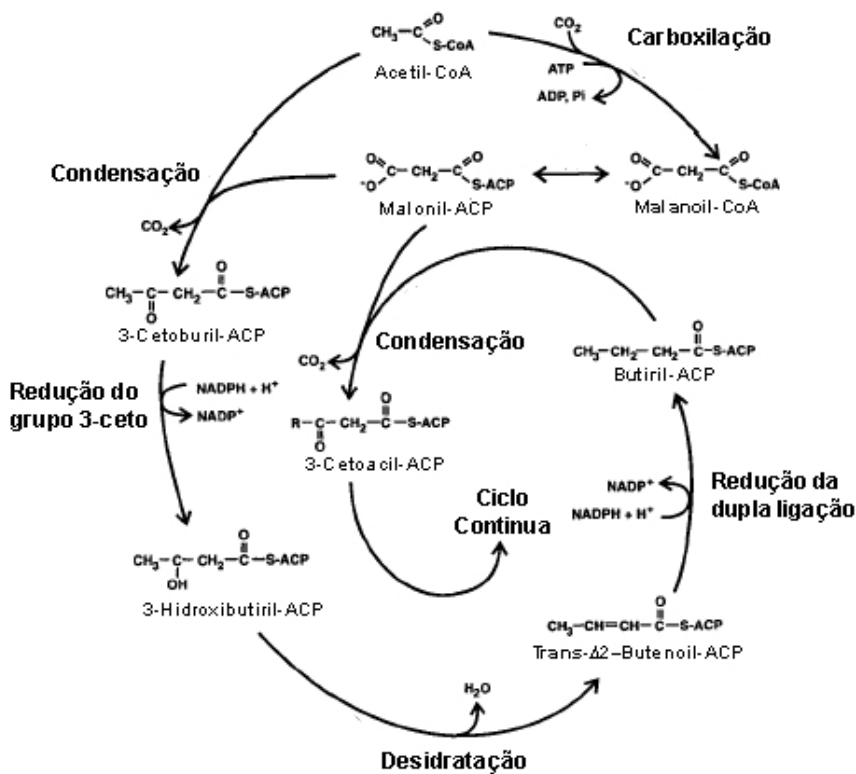


Figura 1. Reações de biossíntese de ácidos graxos saturados. (Adaptado de OHLROGGE e BROWSE, 1995).

No primeiro ciclo de síntese de ácidos graxos, o grupo acetato do acetil-CoA é transferido a uma cisteína específica da enzima 3-cetoacetil-ACP sintase e, então, combinado com malonil-ACP para formar acetoacetil-ACP.

Devido ao fato da enzima FAS (ácido graxo sintase) ser formada por polipeptídeos individuais torna-se possível a ocorrência de alterações estequiométricas nas reações de condensação que constroem as cadeias de ácidos graxos, pelo uso de diferentes isoenzimas nos variados tipos celulares ou segundo os diferentes substratos (SOMERVILLE e BROWSE, 1991).

Posteriormente, o grupo ceto no carbono 3 é reduzido pela ação de três enzimas, para formar uma nova cadeia acil (butiril-ACP), que tem quatro carbonos de comprimento. O butiril-ACP e uma molécula de malonil-ACP tornam-se, então os novos substratos para a enzima condensadora, resultando na adição de outra unidade de dois carbonos à cadeia em crescimento. O ciclo continua até que 16 ou 18 carbonos tenham sido adicionados (NELSON e COX, 2002).

Alguns 16:0-ACP são liberados da maquinaria da ácido-graxo sintase, mas a maioria das moléculas que são alongadas para 18:0-ACP são eficientemente convertidas a 18:1-ACP pela ação de uma dessaturase. A repetição desta seqüência de eventos faz do 16:0-ACP e do 18:0-ACP os principais produtos da síntese de ácidos graxos em plastídios (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Ligações duplas adicionais são inseridas nos ácidos graxos 16:0 e 18:1 por uma série de isoenzimas dessaturases, que são proteínas integrais de membrana encontradas no cloroplasto e no retículo endoplasmático. Cada dessaturase insere uma ligação dupla em uma posição específica na cadeia de ácidos graxos, e as enzimas agem sequencialmente para formar os produtos 18:3 e 16:3 finais (OHLROGGE e BROWSE, 1995). Como a enzima estearil-ACP (Δ^9) dessaturase (SD) catalisa a primeira dessaturação que ocorre para a formação de ácidos graxos polinsaturados, o seu papel é fundamental na determinação da qualidade do óleo (OHLROGGE e JAWORSKI, 1997).

2.2. Composição e qualidade do óleo

Nas sementes de oleaginosas existe uma grande variação na composição dos ácidos graxos que são armazenados nos tecidos de reserva (TÖPFER *et al.*, 1995). Os óleos vegetais não refinados contêm triglicerídeos, fosfatídios, esterol, hidrocarbonetos, tocoferóis, ácidos graxos livres, vitaminas A, D e E e traços de metais (AUGUSTO, 1988).

A composição do óleo de soja varia em função das características genéticas e do ambiente onde é cultivada. Os triglicerídeos representam em média 96% da composição do óleo de soja. Cada triglicerídeo contém três radicais representados pelos ácidos graxos, sendo que, no óleo de soja, 61% são ácidos graxos polinsaturados (LIU, 1997). Existem cinco ácidos graxos principais presentes na fração óleo: palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1), linoléico (C18:2) e linolênico (C18:3). Os dois primeiros são ácidos graxos saturados e os três últimos são os ácidos mono e poliinsaturados, com uma, duas e três duplas ligações respectivamente (YADAV, 1996). Os teores desses ácidos graxos ocorrem, em média, nas proporções de 11%; 4%; 23,4%; 53,2% e 7,8%, respectivamente (LIU e WHITE, 1992). Outras formas de ácidos

graxos são encontradas em menor quantidade, como o ácido araquídico (20:0), palmitoléico (16:1) e mirístico (14:0).

A utilização do óleo para os diversos fins industriais é definida pela composição dos ácidos graxos presentes nas sementes de soja, que afetam diretamente as características físicas e químicas e o valor nutricional do óleo produzido. A estabilidade térmica dos óleos depende de sua estrutura química, sendo que os óleos com ácidos graxos saturados são mais estáveis que os insaturados (EYCHENNE *et al.*, 1998).

A degradação oxidativa de ácidos graxos polinsaturados se dá pela presença de duplas ligações nas cadeias de carbonos, tornando estas moléculas suscetíveis ao ataque oxidativo, ocorrendo assim à formação de compostos que alteram o sabor do produto (DUNTON *et al.*, 1951). Estes também relataram que o ácido linolênico é uma das principais causas da instabilidade oxidativa do óleo de soja. Subseqüente investigação demonstrou que as três duplas ligações contidas no ácido linolênico é que o torna susceptível à oxidação, que resulta na formação de odores e sabores indesejáveis em produtos alimentares.

Dessa forma, o alto teor de ácidos graxos polinsaturados é responsável pela redução da estabilidade à oxidação e da qualidade do óleo de soja, tanto para fins alimentícios quanto industriais como, por exemplo, para a produção do biodiesel (ALONSO e MAROTO, 2000). O ácido oléico não é estável como os ácidos graxos saturados, entretanto, é cerca de 10 vezes mais estável que o ácido linoléico e pelo menos 20 vezes mais estável que o ácido linolênico (ECONOMIC, 1990).

LIU e WHITE (1992) compararam a estabilidade oxidativa de um óleo de canola com seis óleos de soja com diferentes composições de ácidos graxos quanto a valores de peróxidos, valores do conjugado do ácido dienóico e avaliações sensoriais. Os autores utilizaram duas variedades comerciais, Hardin e BSR 101, e quatro linhagens desenvolvidas na Universidade do Estado de Iowa, com baixos teores de ácido linolênico. Por testes químicos e sensoriais os óleos derivados das quatro linhagens foram mais estáveis à oxidação do que o óleo das variedades comerciais de soja e de canola. Os valores de peróxidos e quantificação de sabor dos óleos foram altamente correlacionados com as quantidades iniciais de ácido linolênico. A qualidade e

a intensidade do sabor tiveram correlações negativas com teor de ácido linolênico.

No intuito de aumentar a estabilidade oxidativa do óleo de soja, o processo de hidrogenação química tem sido bastante usado para reduzir o conteúdo de ácidos graxos polinsaturados. No entanto, promove a redução do atrativo econômico de se usar a fração óleo de soja, além de gerar quantidades significativas de ácidos graxos saturados e de isômeros *trans* de ácidos graxos, principalmente o ácido *trans*-oléico (MORAES, 1999). O consumo desses compostos está diretamente relacionado com a incidência de certas doenças cardíacas (YADAV, 1996).

A configuração geométrica dos ácidos graxos tem importância nas propriedades físico-químicas dos óleos e gorduras (NEF e LIST, 1999). A configuração em *trans*, por exemplo, geralmente leva a um aumento do ponto de fusão, em relação à configuração em *cis*. Nas espécies vegetais, todos os ácidos graxos insaturados que ocorrem naturalmente apresentam-se na configuração *cis* (LIU, 1997).

Outro aspecto que influencia a qualidade do óleo é a distribuição dos ácidos graxos na molécula de triacilglicerol. Alguns autores sugerem que ácidos graxos saturados devem ocupar preferencialmente as posições 1 e 2 para maiores ganhos em estabilidade (NEF *et al.*, 1992; NEF e LIST, 1999). Outros trabalhos indicam que a distribuição posicional dos ácidos graxos não tem influência ou efeito na estabilidade oxidativa (LIU, 1997).

2.3. Melhoramento da soja

O melhoramento genético da soja pode ser considerado como um processo contínuo de desenvolvimento de novos genótipos. A maioria dos programas de melhoramento se concentra em objetivos gerais, que são a criação de variedades mais produtivas, resistentes às principais doenças, mais estáveis e melhor adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas e sistemas de cultivo existentes no país.

O conhecimento detalhado da espécie vegetal, como características botânicas, fisiológicas e agrônômicas e seu respectivo controle genético, bem como, informações sobre a natureza e magnitude da variabilidade genética

disponível para cada característica de interesse são de fundamental importância para programas de melhoramento. Disso depende a escolha acertada dos progenitores e do método de melhoramento mais eficiente (VERNETTI, 1983).

O primeiro passo no melhoramento de plantas é a criação de uma população que seja geneticamente divergente obtida pelo cruzamento entre progenitores de bom desempenho e contrastantes ou por mutação induzida no germoplasma melhorado. Partindo-se de uma população base várias estratégias de seleção podem ser usadas. No entanto, o melhorista sempre se preocupa em usar uma estratégia que promova o maior ganho por unidade de tempo e custo. Para tal fim, dispõe-se de técnicas de genética quantitativa que permitem prever o quanto conseguirá de ganho na geração seguinte, utilizando determinada estratégia de seleção. Assim, pode-se decidir pela melhor estratégia, com bases científicas, tendo em vista o quanto de progresso será conseguido na geração seguinte (VENCOVSKY, 1987).

O processo de desenvolvimento de uma nova cultivar de soja pode ser subdividido em três etapas principais: i) escolha dos progenitores e realização da hibridação; ii) avanço de gerações e seleções; e iii) avaliação das linhagens mais promissoras. Em função das estratégias de seleção adotadas e da segregação nas primeiras gerações de autofecundação, o desempenho dessas gerações dificilmente pode ser tomado como referência para a determinação do potencial de uma linhagem. Assim, geralmente após a geração F_6 ou F_7 , inicia-se a avaliação do desempenho dessas linhagens e posteriormente, após a seleção das melhores, são realizados testes em diferentes ambientes.

De acordo com SEDIYAMA *et al.* (1999), programas de melhoramento de soja devem focar os seguintes caracteres: adaptação quanto ao ciclo; hábito de crescimento; altura da planta e da inserção da primeira vagem; acamamento; deiscência das vagens; qualidade da semente; adaptação quanto ao nível de fertilidade do solo; resistência a doenças e pragas; aspectos qualitativos; tolerância a herbicida; produtividade e período juvenil longo.

Nos atuais programas de melhoramento, com raras exceções, pouco se tem investido na melhoria da composição da semente. No entanto, tem surgido uma demanda crescente para tipos especiais de soja que agreguem em suas sementes uma composição mais adequada a determinados usos. De acordo

com WILCOX e GUODONG (1997), a composição das sementes das variedades comerciais dos Estados Unidos, com poucas exceções, tem permanecido inalterada, nos últimos 70 anos, em aproximadamente 40% de proteína e 21% de óleo.

2.3.1 Melhoramento genético para teores de ácidos graxos

Na segunda metade do século XX, originaram-se os primeiros programas de melhoramento da soja visando à alteração de ácidos graxos para obtenção de ganhos em qualidade (DUNTON, 1951). A redução do ácido palmítico e esteárico era desejável para baixar o teor de gordura saturada na dieta humana, reduzindo os problemas cardiovasculares. Entretanto, o aumento do teor de ácidos graxos saturados melhoraria a estabilidade e a vida útil do óleo. O aumento no conteúdo de ácido oléico e a redução nos teores dos ácidos linoléico e linolênico aumentam a estabilidade do óleo, reduzindo ou eliminando a necessidade de hidrogenação química, responsável pela produção de ácidos graxos *trans* (FEHR, 2007).

Segundo HAWKINS *et al.* (1983) as variedades e acessos existentes, nas décadas de 80 e 90, apresentavam pouca variabilidade para os teores de ácidos graxos. Cultivares de soja (*Glycine max*) possuíam teores de ácido linolênico entre 6 e 15% do óleo da semente e em outras espécies do gênero *Glycine*, o teor de ácido linolênico variavam de 11,3 a 27,2% (SMITH, 1981). Com isso, inicialmente o método de melhoramento convencional era baseado na utilização de genótipos mutantes, o que proporcionou o desenvolvimento de genes com alelos mutados, importantes para reduzir os teores dos ácidos palmítico e linolênico, que estão presentes em cultivares atualmente utilizados para produção comercial (FEHR e HAMMOND, 2000; ANAI *et al.*, 2005). Para o aumento do teor de ácido oléico tem-se utilizado como ferramenta mutações e engenharia genética (RAHMAM *et al.*, 1996; KINNEY, 1996).

Alterações genéticas na composição dos ácidos graxos do óleo de soja têm sido bem sucedidas para melhor satisfazer as necessidades dos consumidores. O desejável seria que os óleos de soja comercializados possuíssem três modificações genéticas que são: redução de 8 para 1% do conteúdo de ácido linolênico da semente de soja; aumento do ácido oléico de

25 para 80%; e redução de 11 para 4% do conteúdo de ácido palmítico (FEHR, 2007). Essas alterações são bastante benéficas visto que aumentam a estabilidade oxidativa e vida útil do óleo, reduzindo a hidrogenação química e os teores de gorduras saturadas.

Segundo FEHR (2007) existem cinco passos no desenvolvimento de materiais com conteúdo alterado dos ácidos graxos: (I) obtenção de genes para modificar a composição de ácidos graxos através de melhoramento convencional ou engenharia genética; (II) determinação da modificação na herança; (III) avaliação do impacto dessa modificação em características agrônomicas e na semente; (IV) condução de cruzamentos para desenvolver cultivares aceitáveis; (V) aceitação de mercado para essa nova composição do óleo, que já estão estabelecidos.

Alterações significativas na expressão dos teores de ácidos graxos em sementes de soja têm sido constatadas devido à influência de ambientes contrastantes, como épocas diferentes de plantio ou diferentes temperaturas de desenvolvimento (SCHNEBLY e FEHR, 1993; MORAES, 1999; LANNA, 2002). Sendo assim, a ação do ambiente sobre o *pool* genético que controla o conteúdo de ácidos graxos é de extrema relevância.

2.3.2 Redução do ácido linolênico e herança genética

Para redução do ácido linolênico em sementes de soja, inicialmente buscou-se no germoplasma da soja materiais genéticos com baixos teores desse ácido graxo (WHITE *et al.*, 1961). Embora tenham sido identificadas introduções de plantas com teor de ácido linolênico menor, em relação às cultivares elites, nenhuma delas continha menos que 4% (KLEIMAN e CALVINS, 1982). Posteriormente, em programas de seleção recorrente foi possível aumentar os teores de oléico e reduzir os teores de linolênico, porém as melhores linhas obtidas ainda continham 4,2% deste ácido (WILSON *et al.*, 1981).

A segunda estratégia foi a indução de alterações genéticas utilizando irradiações com raios-X, mas os descendentes produzidos não possuíam a mesma composição dos ácidos graxos dos progenitores mutados (HAMMOND e FEHR, 1975). Com isso, as irradiações com raios-X foram substituídas por

mutagênese química. Sendo produzidos os mutantes A5 com 2,9 a 4,1% de ácido linolênico (HAMMOND e FEHR, 1983) e C1640 com 3,6% de linolênico (WILCOX *et al.*, 1984). A redução de linolênico em C1640 é controlada por um alelo denominado *fan1* (WILCOX e CALVIN, 1987) e em A5 designado *fan1*(A5) (RENNIE e TANNER, 1991).

Através de irradiações na variedade *Bay* foram desenvolvidos os mutantes M5, IL8 com alelos no *loco Fan1*, que foram designados como *fan1*(M5) e *fan1*(IL8) (RAHMAN e TAKAGI, 1997). STOJSIN *et al.* (1998) desenvolveram um mutante RG10 com o alelo *fan1-b*, através do tratamento em C1640.

As bases genéticas de alguns dos alelos no *loco fan1* foram determinadas e indicam que a redução do ácido linolênico em A5 foi, pelo menos, devido à supressão total ou parcial da expressão do gene da enzima ω -3 dessaturase microsomal (BYRUM *et al.*, 1997). BILYEU *et al.* (2003) identificaram três *locos* independentes controlando a produção de ácido linolênico, designados de *GmFAD3-A*, *GmFAD3-B* e *GmFAD3-C*. Os autores verificaram que a redução do ácido linolênico em A5, que possui o alelo *fan1*(A5), foi uma deleção em *GmFAD3-A*. CHAPELL e BILYEU *et al.* (2006) descobriram que o alelo *fan1* em C1640 tem uma mutação no *GmFAD3-A*.

ANAI *et al.* (2005) consideraram a existência de quatro formas do gene *FAD3* designados de *GmFAD3-1a*, *GmFAD3-1b*, *GmFAD3-2a*, *GmFAD3-2b*. Os autores verificaram que o reduzido teor de ácido linolênico nos mutante J18 e M5 é devido a supressão do *GmFAD3-1b*. O *GmFAD3-1a* é o equivalente ao *GmFAD3-B* designado por BILYEU *et al.* (2003), *GmFAD3-1b* é equivalente a *GmFAD3-A*, e o *GmFAD3-2a* é equivalente ao *GmFAD3-C* (FEHR, 2007).

O tratamento de FA47437 com metanossulfonato de etila produziu um mutante com teor de ácido palmítico maior do que o seu progenitor, e foi designado de A23 (BUBECK *et al.*, 1989). FEHR e HAMMOND (1998) cruzaram A5 e A23 tentando combinar o reduzido teor de ácido linolênico de A5 com alto teor de ácido palmítico de A23. Como resultado, obtiveram A16 e A17 com cerca de 2,5% de ácido linolênico. Um estudo posterior da herança em A23 indicou o alelo *fan2* como mutante (FEHR *et al.*, 1992). O alelo *fan2* de A16 e seu descendente IA3018 têm um único nucleotídeo mutado no

GmFAD3-C que resulta na substituição de uma tirosina por uma histidina (BILYEU *et al.*, 2006).

FEHR *et al.* (1992) estudaram o controle genético do teor de ácido linolênico nas linhagens de soja A16 e A17 (2,5% de ácido linolênico), que foram cruzadas reciprocamente com Century 84 (7,7% de ácido linolênico), com a linhagem mutante C1640 (3,7 % de ácido linolênico) e com seus parentais A5 e A23. Observaram uma segregação nas linhas $F_{2:3}$ na proporção de 1:14:1, no cruzamento de A16 e A17 com Century 84, significando uma segregação de dois locos independentes. A análise indicou que A16 e A17 possuíam o alelo *fan*(A5) de A5 e o alelo *fan2*(A23) de A23. A distribuição contínua no cruzamento de A16 e A17 com Century 84 indicaram que o efeito genético e ambiental são importantes para a expressão dos teores de ácido linolênico e que, conseqüentemente, o teor deste ácido pode ser considerado uma característica quantitativa em programas de melhoramento.

GESTEIRA (1997), analisando a segregação do cruzamento de BARC-12 (acesso com baixo teor de ácido linolênico) e CAC-1 (cultivar com teor normal de ácido linolênico), em sementes $F_{2:3}$, encontrou uma proporção de 1:14:1, concluindo que pelo menos dois genes com segregação independente são responsáveis pelo teor de ácido linolênico nesse cruzamento. A distribuição contínua indica que genes com efeitos menores também foram importantes na expressão dessa característica. Resultados semelhantes foram encontrados por WILCOX e CALVINS (1987) e RENNIE e TANNER (1991).

Um segundo alelo no *locos fan2* foi identificado em AX5152-44 por análise molecular (BILYEU *et al.*, 2005). Esse alelo possui uma mutação em um único nucleotídeo *GmFAD3-C* que resulta na substituição de um glutamato por uma glicina. FEHR e HAMMOND (2000) através de mutagênese em A89-1440003 produziram A26 com um alelo mutante *fan3*. Quando combinados os alelos *fan1* (A5), *fan2* e *fan3* produziu A29 com apenas 1% de ácido linolênico (FEHR e HAMMOND, 2000; ROSS *et al.*, 2000). O alelo *fan3* tem uma mutação no gene *GmFAD3-B* (BILYEU *et al.*, 2006). ANAI *et al.* (2005) trabalhando com raio-X na variedade *Bay* desenvolveram o mutante M24, que possui o alelo *fan3*.

Portanto, para o desenvolvimento de linhagens com composições desejáveis de ácidos graxos é necessário conhecer a natureza da herança e a variação desse caráter.

2.3.3 Herdabilidade e seleção

O conhecimento das estimativas dos parâmetros genéticos é de fundamental importância no delineamento de programas de melhoramento, pois permite prever a possibilidade de sucesso com a seleção. A herdabilidade é um dos parâmetros genéticos, pois fornece a proporção da variância genética presente na variância fenotípica total, ou em termos de unidade de seleção, a fração do diferencial de seleção esperado pelo ganho, quando a seleção é praticada em uma referida unidade (HANSON, 1963). A herdabilidade pode ser definida através de três princípios: como medida de semelhança entre pai e filho; porção genética no sentido amplo; e porção genética no sentido restrito (JACQUARD, 1983).

A herdabilidade no sentido amplo expressa a razão entre toda a variância aditiva e não aditiva e a variância fenotípica total (ALLARD, 1971). O genótipo é considerado a unidade de seleção em relação ao ambiente. Assim, ocorre segregação gênica, e novas combinações são formadas, podendo exibir interações intra-alélicas (efeito dominância) e interações inter-alélicas (efeito epistático). Essa diferença entre os efeitos de alelos em combinação e seus efeitos médios na população são efeitos epistáticos e de dominância, sendo os efeitos epistáticos transferidos em partes e os de dominância, dependentes da nova combinação gamética. Na herdabilidade no sentido restrito, o valor genético aditivo é considerado como critério de seleção em relação ao ambiente. A variância genética aditiva, que é a diferença associada aos efeitos médios dos genes, é de grande interesse para o melhorista, uma vez que os efeitos gênicos aditivos são transferidos na sua totalidade (FALCONER, 1987), podendo ser usada para estimar a resposta ou ganho no processo seletivo em longo prazo. NYQUIST (1991) salientou que o valor principal da herdabilidade é quantificar o progresso que se pode obter com a seleção.

A estimativa de herdabilidade refere-se a uma característica de uma população, e é específica para as condições experimentais nas quais os

genótipos foram estudados. Logo, é difícil generalizar estimativas de uma população para outra, ou para diferentes condições experimentais (DUDLEY e MOLL, 1969), portanto a herdabilidade de uma determinada característica não é imutável. A herdabilidade pode aumentar por meio da introdução de mais variação genética na população ou pela maior estabilização do ambiente (RAMALHO *et al.*, 1993).

As estimativas de herdabilidade na geração F_2 para teor de ácido linolênico obtidas por FEHR *et al.* (1992) no cruzamento de A16 e A17 (linhagens de soja com 2,5% de ácido linolênico) com Century (variedade comercial), foram altas, 98% e 97%, respectivamente, o que justifica fazer seleção em sementes na geração F_2 num programa de desenvolvimento de cultivar com baixo teor de ácido linolênico. GESTEIRA *et al.* (2003) também encontraram valores altos de herdabilidade (75%) para os teores do ácido linolênico em sementes F_2 e famílias F_3 do cruzamento de CAC-1 com BARC-12.

CHERRAK *et al.* (2003) estudando parâmetros genéticos, em uma população oriunda do cruzamento entre Anand (com conteúdo normal de ácidos graxos) e o genótipo N97-3708-13 (com baixos teores dos ácidos linolênico e esteárico), encontraram herdabilidades para ácido palmítico de 65% e para ácido linolênico de 73%. Segundo os autores, pode-se esperar a recuperação de baixos teores de ácido palmítico e linolênico em linhagens puras através da seleção individual e avanço da geração F_2 .

PANTHEE *et al.* (2006) trabalhando com uma população RIL com 101 indivíduos na geração F_6 , oriunda do cruzamento N87-984-16 X TN9399 obtiveram herdabilidade de 66% para ácido palmítico e 77% para ácido linolênico.

A herdabilidade está contida em quase todas as fórmulas relacionadas aos métodos de melhoramento e sua magnitude é de extrema importância para tomada de decisões práticas de seleção. Diversas estratégias de seleção podem ser adotadas em trabalhos de melhoramento, cabe ao pesquisador optar pela metodologia mais eficiente, que promova maior ganho por unidade de tempo e custo (PATERNIANI e CAMPOS, 1999). Através da estratégia de seleção e do ganho que ela proporcionará, pode-se orientar, de maneira mais

efetiva, um programa de melhoramento, bem como predizer o sucesso do esquema seletivo adotado (CRUZ e REGAZZI, 2004).

Na identificação de genótipos superiores numa população vários procedimentos podem ser utilizados. Estes podem considerar o comportamento do indivíduo, o desempenho da família, a superioridade relativa dos indivíduos dentro da família e as informações simultâneas do indivíduo e dos demais componentes da mesma família (seleção combinada) (FALCONER, 1987).

A seleção individual consiste na escolha direta dos indivíduos fenotipicamente superiores, para o estabelecimento da geração seguinte. Em seus estudos, MALLMANN *et al.* (1994) consideraram a seleção individual como método muito utilizado por melhoristas de plantas autógamas, a partir da geração F₂. Para caracteres de alta herdabilidade, a metodologia torna-se mais eficiente, pois a elevada representatividade do valor genético pelo valor fenotípico propicia maior capacidade de obtenção de ganhos a cada geração.

CARVER *et al.* (1986) promoveram oito ciclos de seleção para alto teor de ácido oléico no intuito de promover o decréscimo indireto da percentagem de ácido linolênico na semente de soja. O teor de ácido oléico aumentou de 1,15% a 2,64% por ciclo de seleção, estando dentro do esperado. Entretanto, não foram constatadas mudanças no teor de ácido linolênico, indicando que os genes que governam esses caracteres não foram fixados após seis ciclos de seleção. BRAVO *et al.* (1999) compararam a seleção dentro de famílias ou entre linhas para os teores de ácidos graxos e não constataram eficiência em qualquer um dos métodos.

2.4 Divergência genética utilizando Marcadores Microsatélites

A manipulação do DNA tornou-se possível com as técnicas de biologia molecular, culminando no surgimento dos vários tipos de marcadores moleculares disponíveis (LANZA *et al.*, 2000). Por fornecerem um número ilimitado de polimorfismos com base no DNA e serem independentes dos efeitos ambientais e do estado fisiológico da planta, os marcadores moleculares são considerados excelentes ferramentas no auxílio do melhoramento genético, pois permitem a identificação precoce e precisa de

indivíduos com uma melhor combinação de alelos favoráveis (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

O “*fingerprinting*” molecular, que é a “impressão digital” de um determinado genótipo, permite a aquisição de um perfil genético e diferenciação inequívoca entre genótipos para caracterização e identificação de cultivares. Em programas de melhoramento, possibilita a maximização da divergência genética de uma população, através da escolha de progenitores contrastantes para a ocorrência de um maior número de recombinações nas populações segregantes. Em contrapartida, progenitores menos divergentes podem facilitar a recuperação do genótipo recorrente em programas de retrocruzamento (ABDELNOOR, 1994).

Vários autores vêm demonstrando que marcadores genéticos podem ser utilizados para introgressão de genes através de retrocruzamentos (SMITH *et al.*, 1987; HILLEL *et al.*, 1990; HOSPITAL *et al.*, 1992). Segundo HOSPITAL *et al.* (1992), antes de montar qualquer experimento de introgressão de alelos, o número de genes envolvidos na seleção e o nível de recuperação do genoma devem ser definidos. O nível de recuperação do genoma está fortemente associado ao número e a distribuição dos marcadores de DNA nos locos (RIBAUT *et al.*, 2002). OPENSHAW *et al.* (1994), utilizando simulação, relataram que cerca de 80 marcadores co-dominantes uniformemente distribuídos ao longo do genoma são suficientes para recuperar 99% do genoma do progenitor recorrente em três gerações de retrocruzamento. Este autor acrescenta ainda que, sem a utilização dos marcadores, esta mesma estimativa seria alcançada com seis a sete gerações de retrocruzamentos.

De acordo com critérios genéticos, os marcadores moleculares podem ser classificados em dois tipos principais: a) marcadores moleculares loco-específicos co-dominantes (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*; SSR - *Simple Sequence Repeat*, SNP – *Simple Nucleotide Polymorphism*) e b) marcadores loco não específicos dominantes (RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*; AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism*; ISSR – *Inter Simple Sequence Repeat*) (SOUZA, 2001). Esses marcadores também podem ser classificados de acordo com a metodologia usada para identificá-los, sendo classificados em duas categorias: 1) Hibridização (RFLP) e 2)

Amplificação do DNA via PCR (Reação da polimerase em cadeia) (RAPD, SSR, ISSR, AFLP e SNP).

Dentre os marcadores moleculares disponíveis, os microssatélites são os mais indicados para a diferenciação varietal. Microssatélites, também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*) correspondem a seqüências de DNA com poucos pares de bases repetidas “*in tandem*”. Cada microssatélite constitui um loco genético altamente polimórfico, cujos diferentes alelos são resultantes das variações no número dessas repetições (SENIOR *et al.*, 1998; SMITH *et al.*, 1997). Esses marcadores possuem elevado conteúdo de informação genética e são amplamente distribuídos no genoma, além de possuir a vantagem de serem baseados em uma metodologia simples e rápida.

Polimorfismo de seqüências repetitivas AT e ATT em soja foram encontradas por AKKAYA *et al.* (1992). Estas foram utilizadas para desenhar *primers* e amplificar SSRs de seqüências obtidas do banco de dados do “Genbank”. Trabalhos posteriores, demonstraram que os microssatélites eram poderosos marcadores genéticos em soja, pois eram altamente polimórficos, multi-alelicos e encontrados ao longo do genoma (DIWAN e CREGAN, 1997). CREGAN *et al.* (1999), trabalhando com três populações de mapeamento de soja, incluindo o mapa da soja do USDA-ARS-ISU, mapearam 606 locos SSRs e encontraram 20 grupos de ligação correspondentes aos 20 cromossomos da soja. SONG *et al.* (2004) incluíram 12 a 29 novos marcadores SSR em cada grupo de ligação da soja. Estes autores obtiveram, utilizando o software JoinMap para combinar os cinco mapas em um mapa genético integrado da soja, 1849 marcadores nos 20 grupos de ligação da soja, sendo 1015 marcadores microssatélites.

Neste sentido, marcadores microssatélites têm sido amplamente utilizados na caracterização e avaliação da diversidade genética entre genótipos de soja (NARVEL *et al.*, 2000; TANYA *et al.*, 2001).

3. METODOLOGIA

3.1. Materiais genéticos e procedimentos experimentais

Em etapa inicial de cruzamentos, foram utilizados neste trabalho, como materiais genéticos de soja a linhagem CS303TNKCA e a variedade Tucunaré que foram cruzadas com o genótipo A29. A CS303TNKCA (3% de ácido linolênico) é uma isolinha, desenvolvida pela Universidade Federal de Viçosa, tendo como progenitor recorrente a variedade Monarca e como progenitor doador o acesso BARC 12. A variedade Tucunaré, desenvolvida pela Fundação Matogrosso, é uma variedade amplamente cultivada no Brasil Central, apresentando um elevado teor de óleo. O genótipo A29 (1% de ácido linolênico), desenvolvido através de mutação por pesquisadores da Universidade Estadual de Iowa (EUA), foi utilizado como fonte doadora de genes para baixos teores de ácido linolênico.

Em etapas subseqüentes do programa, cinco linhagens de soja da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC), CD 01RR 8384, CD219RR, CD 222, CD 224, e CD 225RR, serão utilizadas como progenitores recorrentes. Sendo que destas, três linhagens (CD 01RR 8384, CD 219RR e CD 225RR) contém o gene de resistência ao glifosato (*Roundup-ready*). Essas linhagens farão parte do programa de retrocruzamentos, onde sua elucidação neste trabalho se faz necessária, pois as plantas selecionadas na geração F₂, através de fingerprinting molecular, levam em consideração o grau de similaridade com estes progenitores.

O experimento foi instalado em abril de 2006 e conduzido em casa de vegetação, no setor de estufas da UFV. As sementes foram semeadas em vasos plásticos contendo três litros de solo previamente adubado.

Inicialmente, foram efetuados cruzamentos entre A29 x CS303TNKCA (AC) e entre A29 x Tucunaré (AT), obtendo-se sementes F₁ (Figura 2). Todas essas combinações híbridas foram plantadas e autofecundadas em casa de vegetação para obter as progênies F₂ (populações segregantes). Foram analisadas 271 sementes F₂ do cruzamento AC e 239 do cruzamento AT. Individualmente, cada semente F₂ foi submetida à microanálise não destrutiva

para teor de ácidos graxos por meio de cromatografia gasosa. Com isso, 30 sementes de cada F_2 dos cruzamentos AC e AT com baixos teores de ácido linolênico foram selecionadas. Todas essas sementes selecionadas foram plantadas obtendo-se plantas F_2 . Das plantas F_2 foram extraídas amostras de DNA de folha para análises com marcadores microssatélites (*fingerprinting*), com intuito de selecionar indivíduos mais similares das linhagens da COODETEC para reduzir o número de retrocruzamentos nas etapas subseqüentes do programa. Após essa análise foram selecionadas, para cada cruzamento, quatro plantas geneticamente mais próximas de cada um dos cinco progenitores recorrentes e que confirmaram a condição de baixo teor de ácido linolênico nas sementes F_3 , ou seja, para cada cruzamento inicial (AC e AT) foram selecionadas 20 plantas. As progênies selecionadas sob estas condições foram cruzadas com os cinco progenitores recorrentes obtendo-se sementes híbridas de cruzamentos triplos (F_1T) (Figura 2).

A população F_3 foi obtida através da autofecundação dos indivíduos selecionados em F_2 de cada cruzamento (AC e AT). Foram coletadas todas as sementes F_3 e a análise não destrutiva do teor de ácido graxo, por cromatografia gasosa, foi feita em “bulk” cortando-se 10 sementes por planta.

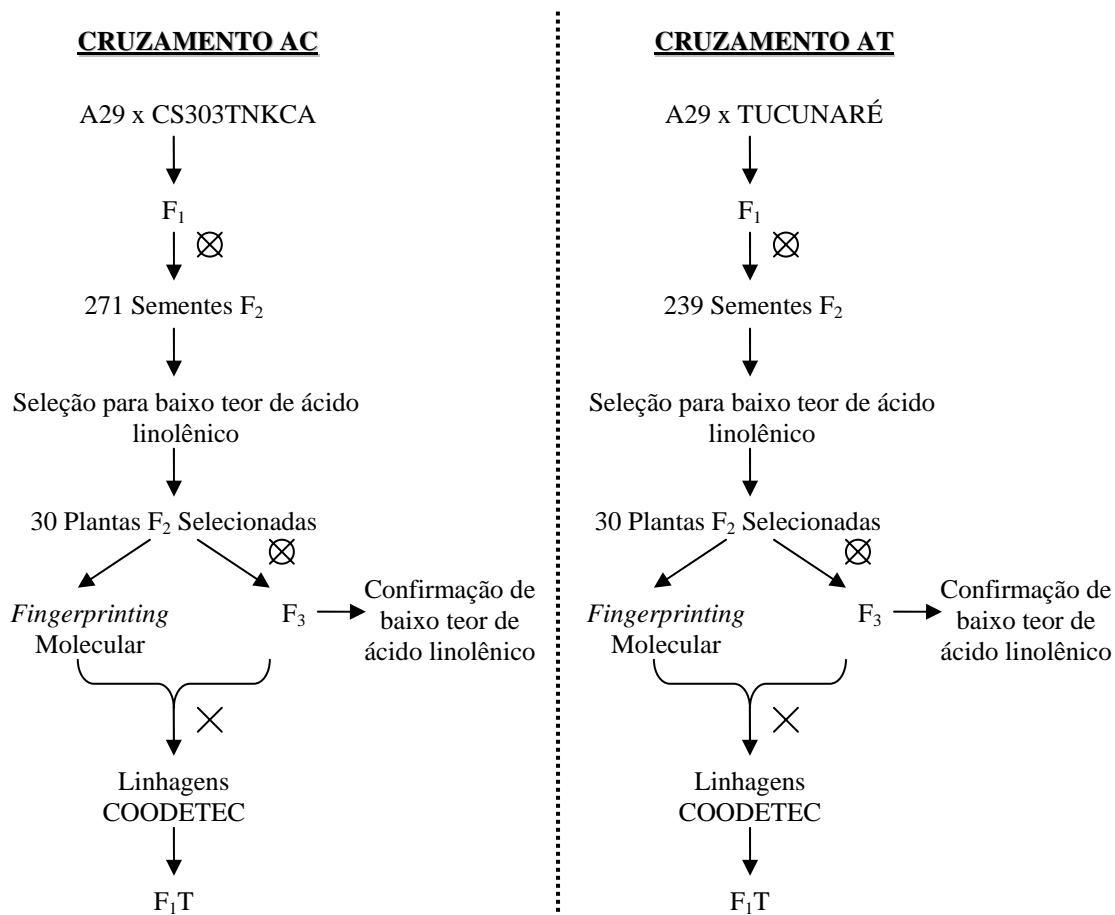


FIGURA 2: Esquema para introgressão de genes para baixo teor de ácido linolênico.

3.2 Análise dos teores de ácidos graxos

A identificação e a quantificação de ácidos graxos presentes na fração óleo das sementes de soja (palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico) foi realizada por cromatografia gasosa. De forma a preservar o poder de germinação da semente, uma porção de 15 mg de cada semente foi cortada no lado oposto do embrião e triturada manualmente, utilizando-se uma lâmina. Em cada amostra de 15 mg do material triturado foi adicionado 1 mL de hexano, sendo a mistura mantida a 4 °C por cerca de 16 h, sob atmosfera de N₂. Após esse tempo, a solução de lipídios em hexano foi transferida para outro tubo e o solvente, evaporado por borbulhamento de N₂. Para a obtenção dos ésteres

metílicos, foi utilizada a metodologia descrita por BUBECK *et al.* (1989). À fração lipídica foi adicionado 0,4 mL de metóxido de sódio 1 M, sendo os tubos mantidos em banho-maria, a 30 °C, por cerca de uma hora. Em seguida, foram acrescentados 1 mL de água deionizada e 1,5 mL de hexano. Após uma hora, com o auxílio de uma pipeta, cerca de 0,75 mL da fase orgânica foi transferida para outros tubos, aos quais foram adicionados 2 mg de sulfato de sódio anidro.

Finalmente, após a derivatização, 1 µl da fase orgânica obtida foi injetada em cromatógrafo a gás GC-17A, equipado com auto-injetor AOC-17 e integrador C-R7A, marca SHIMADZU. A coluna utilizada foi a do tipo Carbowax (30 m × 0,32 mm). As condições de análise empregadas foram as seguintes: temperatura da coluna igual a 225 °C; do injetor, 245 °C; e do detector, 280 °C. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio, com um fluxo de 1,3 mL/min.

3.3 Extração de DNA

O DNA de folha foi extraído pelo protocolo descrito por DOYLE & DOYLE (1990), com algumas modificações propostas por ABDELNOOR *et al.* (1995). A concentração do DNA foi estimada por espectrofotometria, considerando que 1 unidade de absorvância a 260 nm equivale a uma solução de 50 µg de DNA por mL. Com base na concentração estimada, procedeu-se à diluição das amostras para uma concentração final de 10 ng/µl.

3.4 Quantificação do DNA

O DNA total obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão de corrida SB 1X (hidróxido de sódio 0,01M e ácido bórico 0,0625M, pH 8,0), contendo 0,1 mg/mL de brometo de etídio, para avaliar sua integridade e estimar a sua quantidade. As bandas do DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (STRATAGENE).

3.5 Condições de amplificação e eletroforese

As reações de amplificação foram efetuadas em um volume total de 15 μ L contendo: 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 50 mM de KCl; 2 mM de MgCl₂; 0,1% triton x100; 100 μ M de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP); 0,3 μ M de cada *primer*, uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase e, finalmente, 30 ng de DNA.

As misturas de reação foram submetidas à amplificação por meio da técnica de PCR, em termociclador, com as seguintes condições: 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C, e 2 min a 72 °C; uma etapa final de 7 min a 72 °C.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida a 10% durante 3 horas a 140 volts. Para a obtenção das imagens, os géis foram corados em solução de brometo de etídio (10 mg/mL), visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (STRATAGENE).

3.6 Seleção de *primers* de microssatélites

De um total de, aproximadamente, 600 pares de *primers* de microssatélites disponíveis para soja no Laboratório de Genética Molecular de Plantas do BIOAGRO, foram testados 191 e selecionados 65 polimórficos para obter dados moleculares dos progenitores (Quadro 1). Os *Primers*, que apresentavam polimorfismo entre A29 e CS303TNKA e entre A29 e Tucunaré e ao mesmo tempo possuíam as mesmas bandas para as linhagens da COODETEC, foram selecionados para serem utilizados nos indivíduos F₂ selecionados. Dos 65 *primers* selecionados nos progenitores apenas 12 foram passados na população F₂ do cruzamento entre A29 e CS303TNKCA: Satt102, Satt173, Satt178, Satt180, Satt191, Satt238, Satt267, Satt279, Satt317, Satt345, Satt405, Satt431. Para o cruzamento entre A29 e Tucunaré foram selecionados 14 *primers*: Satt100, Satt102, Satt178, Satt180, Satt191, Satt279, Satt302, Satt307, Satt317, Satt345, Satt405, Satt472, Satt476, Satt512.

Quadro 1. Primers SSR, grupo de ligação (GL) e seqüências de acordo com o mapa integrado da soja segundo SONG *et al.* (2004).

PRIMER	GL	SEQÜÊNCIA (5' → 3')	SEQÜÊNCIA (3' → 5')
Satt 200	A1	GCGATAAATGGTTAATGTAGATAA	GCGAAAGGACAGATAGAAAGAGA
Satt 233	A2	AAGCATACTCGTCGTAAC	GCGGTGCAAAGATATTAGAAA
Satt 424	A2	CAACCTGTATTCCACAAAAAATCTCACC	GCGCCCAATTTGACTATAAAATAAAGT
Satt 415	B1	GCGTCTCCCTAATCTTCAAGC	GCGTGTGACGGTTCAAATGATAGTT
Satt 066	B2	GGGAAGCTTAATAATGAAAATGACAC	TTGATCACTTCTGTAACATTC
Satt 070	B2	TAAAAATTAATACTAGAAAGACAAC	TGGCATTAGAAAATGATATG
Satt 534	B2	CTCCTCCTGCGCAACAACAATA	GGGGATCTAGGCCATGAC
Satt 180	C1	TCGCGTTTTGTCAGC	TTGATTGAAACCCAATA
Satt 476	C1	TTTGCTGATTAAAAAACAAAACCTG	TTGTTAGAATGGGGACTACTTCACTA
Satt 100	C2	ACCTCATTTTGGCATAAA	TTGGAAAACAAGTAATAATAACA
Satt 307	C2	GCGCTGGCCTTTAGAAC	GCGTTGTAGGAAATTTGAGTAGTAAG
Satt 520	C2	GCGGTGTGCAAGAGTGACA	GCGCATTGGACTTTCTA
Satt 557	C2	GCGGGATCCACCATGTAATATGTG	GCGCACTAACCTTTATTGAA
Satt 077	D1a	GATCTAAAGTCTGATATTTTAACTA	AAAAGGAGAAGGAATGC
Satt 184	D1a	GCGCTATGTAGATTATCCAAATTACGC	GCCACTTACTGTTACTCAT
Satt 267	D1a	CCGGTCTGACCTATTCTCAT	CACGGCGTATTTTTATTTTG
Satt 383	D1a	CGATCTAACACGCATATTTCTCTG	CTTCCCTAATATTGGCAACCTCTATG
Satt 005	D1b	TATCCTAGAGAAGAACTAAAAA	GTCGATTAGGCTTGAATA
Satt 271	D1b	GTTGCAGTTGTGCGTGGGAGAGAG	GCGACATAGCTAATTAAGTAAGTT
Satt 546	D1b	TGAGCGATCAAGAAGCACTTA	TTTGGATCGCATAACACTTTA
Satt 135	D2	CACGGATTTTAAATCATTATTACAT	TTCCAATACCTCCCAACTAAC
Satt 186	D2	GGGAAGTTATAAGCAGAT	GGGAATCCATTCTGATGAGT
Satt 301	D2	GCGAAACACTCCTAGTTGATTACAAA	GCGATATAATGCACAAAGAAATTAAGA
Satt 528	D2	GCGGGTGCAGGGTTTACTGTGTAAT	GCGGCTGGTCTTGAAAAA
Satt 112	E	TGTGACAGTATACCGACATAATA	CTACAAATAACATGAAATATAAGAAATA
Satt 114	F	GGGTTATCCTCCCAATA	ATATGGGATGATAAGGTGAAA
Satt 146	F	AAGGGATCCCTCAACTGACTG	GTGGTGGTGGTGAAGACTATTAGAA
Satt 252	F	GCGAATTTGGATTAATTAATTTATG	GCGCTCGGTCCTCTCAAATAAGGTCTC
Satt 554	F	GCGATATGCTTTGTAAGAAAATTA	GCGCAAGCCCAAATATTACAAATT
Satt 115	G	GGTTCGTTTTTATTGATG	ACGACGAAATTGATGATAA
Satt 131	G	AATTTCCATTATCATTTAGAA	GGCCTTCATTCCAAAAC
Satt 163	G	AATAGCACGAGAAAAGGAGAGA	GTGTATGTGAAGGGGAAAAACTA
Satt 191	G	CGCGATCATGTCTCTG	GGGAGTTGGTGTCTTCTGTG
Satt 303	G	AAAAGCGACGACCTATG	TGAACGTTCTATCAACACA
Satt 352	G	GCGAATGTATTTTGTCTCCATCAA	TGATAAGCCAAAAATGGAAGCATAG
Satt 472	G	GCGAATACATAAACTCAAATTCAAATCATA	GCGTTCTATAAATTTCAATCATAGTTTCAAT
Satt 181	H	TGGCTAGCAGATTGACA	GGAGCATAGCTGTTAGGA
Satt 192	H	CACCGCTGATTAAGATTTTT	CGCTGAGTTGTTTTTCATC
Satt 279	H	GCGCAAAAGGACGCCACCAATAG	GCGGTGATCGGATGTTATAGTTTCAG
Satt 302	H	GCGAACTGTAGTTTACTAAAAATAAGTG	GCGGACTGAATTAATATTGGTGTGAATT
Satt 317	H	GCGAACAACTTTCTATACATGATAACA	GCGGGTATATTTTGTACATAAGTTGGAA
Satt 419	I	GCGCCATGACGCCAGCTTGCTTTTCC	GCGCCATTATATACAAATTACGATCAT
Satt 571	I	GGGTAGGGGTGGAATATAAG	GCGGGATCCGCGGATGGTCAAAG
Satt 405	J	GCGGAAATTGTGAAAATGTCCTAGTAA	GCGTTTTAGTCGTTAAATTTATGAAATG
Satt 431	J	GCGTGGCACCCTTGATAAATAA	GCGCACGAAAGTTTTCTGTAACA
Satt 102	K	CACCTTGCTTCAAATTC	AATAAGTGAGAGCATAGAAAATAC
Satt 178	K	GGGAAAATTCTTTTCATATAGATG	GGGGTTGAGATATTTTGTTTCATAC
Satt 242	K	GCGTTGATCAGGTCGATTTTTATTTGT	GCGAGTGCCAATACTACTTTTATGA
Satt 337	K	GCGTAAATCTGATATATGTTACCACTGA	GCGTAATACGAAAACATAATTAGCCTA
Satt 475	K	AAATGCAACTTACACAACTTTAT	TGCTTGCTCAATTTGGATGAGTG
Satt 555	K	GCGGTTGGCTTTGATGATGT	TTACCGCATGTTCTTGGACTA
Satt 156	L	CGCACCCCTCATCCTATGTA	CCAATAATCCAGGGACTTACTT
Satt 182	L	GGTCCACATGAAATGAAGGT	TCTCAGCCTGCAAAGAAA

Satt 229	L	TGGCAGCACACCTGCTAAGGGAATAAA	GCGAGGTGGTCTAAAATTATTACCTAT
Satt 238	L	GCGCCATTTTAATGATTTATTTA	GCGGAAAGAAGAGGAAGAAAG
Satt 418	L	GCGAAAGCACATATGGGTTTGAAT	GCGAGGGCATATATATGATGAGGTA
Sat_113	L	GGAGCATACAGCCTTAAGAGAT	TGGGCATCAAACCTAAGAAAA
Satt 540	M	CTGGCGAATCAAGCTTTGTAAC	CCGTGATTGCGAAGAGGATATT
Satt 567	M	GGCTAACCCGCTCTATGT	GGGCCATGCACCTGCTACT
Satt 521	N	GCGCTTCACTCTGGTGTAGTGTAG	GCGTTAGATAACGACACATTATTA
Satt 094	O	CCAAGTGCCAATGAAG	ATCCATGGTTTTTTGATG
Satt 173	O	TGCGCCATTTATTCTTCA	AAGCGAAATCACCTCCTCT
Satt 345	O	CCCCTATTTCAAGAGAATAAGGAA	CCATGCTCTACATCTTCATCATC
Sat_108	O	AAAAATCTATTCACCTTTGAGTCTA	TTGAAAGAGTCACGTCTATTCTAT
Satt 512	*	GCGTGCTAAAGCTCATGAGGAG	GCGGGCGTAATAACTCAAATTTGTTT

* Não posicionados no mapa integrado da soja segundo SONG *et al.* (2004)

3.7 Análises Estatísticas

Na realização das análises estatísticas, foi utilizado o aplicativo computacional em genética e estatística, denominado programa GENES (CRUZ, 2001).

3.7.1 Variâncias Fenotípicas, Genotípicas e de Ambiente nas progênes F₂

A variância fenotípica foi estimada utilizando os valores fenotípicos obtidos das plantas F₂, segundo a expressão:

$$\hat{\sigma}_F^2 = \sum (X_i - \bar{X})^2 / n - 1$$

Em que:

$\hat{\sigma}_F^2$ = variância fenotípica;

X_i = dados fenotípicos dos teores de ácidos graxos avaliados em cada planta F₂;

\bar{X} = média da característica avaliada nas plantas F₂; e

n = número de plantas avaliadas.

Foi estimada a variância de ambiente pela média ponderada das variâncias dos progenitores:

$$\hat{\sigma}_E^2 = \frac{n_1 \hat{\sigma}_{P_1}^2 + n_2 \hat{\sigma}_{P_2}^2}{n_1 + n_2}$$

Sendo:

$\hat{\sigma}_E^2$ = variância de ambiente estimada;

$\hat{\sigma}_{P_1}^2$ e $\hat{\sigma}_{P_2}^2$ = variâncias fenotípicas estimadas dos progenitores; e

n_1 e n_2 = número de plantas dos progenitores P_1 e P_2 , respectivamente.

A variância genotípica foi estimada pela diferença entre as estimativas da variância fenotípica e da variância de ambiente, ou seja:

$$\hat{\sigma}_G^2 = \hat{\sigma}_F^2 - \hat{\sigma}_E^2$$

3.7.2 Covariâncias fenotípicas, genotípicas e de ambiente nas progênes F_2

A covariância fenotípica foi estimada diretamente utilizando-se os valores fenotípicos dos teores de ácidos graxos, obtidas nas progênes F_2 .

A covariância ambiental foi estimada pela expressão:

Em que:
$$\hat{CÔV}_E(X_1, X_2) = \frac{\hat{CÔV}_F(X_1, X_2)_{P_1} + \hat{CÔV}_F(X_1, X_2)_{P_2}}{2}$$

= covariância de ambiente entre as características X_1 e X_2 ;

$\hat{CÔV}_F(X_1, X_2)_{P_1}$ e $\hat{CÔV}_F(X_1, X_2)_{P_2}$ = covariância fenotípica entre as características X_1 e X_2 , nos progenitores P_1 e P_2 , respectivamente.

E a covariância genotípica foi obtida pela diferença entre a covariância fenotípica das características X_1 e X_2 [$\hat{CÔV}_F(X_1, X_2)$] e a covariância de ambiente [$\hat{CÔV}_E(X_1, X_2)$].

3.7.3 Correlações fenotípicas, genotípicas e de ambiente nas progênes F_2

As correlações fenotípicas para os teores dos ácidos graxos foram estimadas como proposto por FALCONER (1987):

$$r_{F_{X_1 X_2}} = \frac{\hat{CÔV}_F(X_1, X_2)}{\sqrt{\hat{\sigma}_{F_{X_1}}^2 \times \hat{\sigma}_{F_{X_2}}^2}}$$

Sendo:

$r_{F_{X_1 X_2}}$ = coeficiente de correlação fenotípica entre as características X_1 e X_2 ;

$\widehat{COV}_F(X_1, X_2)$ = covariância fenotípica entre as características X_1 e X_2 ;

$\widehat{\sigma}_{F_{X_1}}^2$ e $\widehat{\sigma}_{F_{X_2}}^2$ = variâncias fenotípicas das características X_1 e X_2 , respectivamente.

Os coeficientes de correlações genotípica e de ambiente foram obtidos pelas expressões:

$$r_{G_{X_1X_2}} = \frac{\widehat{COV}_G(X_1, X_2)}{\sqrt{\widehat{\sigma}_{G_{X_1}}^2 \times \widehat{\sigma}_{G_{X_2}}^2}} \quad \text{e} \quad r_{E_{X_1X_2}} = \frac{\widehat{COV}_E(X_1, X_2)}{\sqrt{\widehat{\sigma}_{E_{X_1}}^2 \times \widehat{\sigma}_{E_{X_2}}^2}}$$

em que:

$r_{G_{X_1X_2}}$ = coeficiente de correlação genotípica entre as características X_1 e X_2 ;

$\widehat{COV}_G(X_1, X_2)$ = covariância genotípica entre as características X_1 e X_2 ;

$\widehat{\sigma}_{G_{X_1}}^2$ e $\widehat{\sigma}_{G_{X_2}}^2$ = variâncias genotípicas das características X_1 e X_2 ;

$r_{E_{X_1X_2}}$ = coeficiente de correlação de ambiente entre as características X_1 e X_2 ;

$\widehat{COV}_E(X_1, X_2)$ = covariância de ambiente entre as características X_1 e X_2 ;

$\widehat{\sigma}_{E_{X_1}}^2$ e $\widehat{\sigma}_{E_{X_2}}^2$ = variâncias de ambiente das características X_1 e X_2 .

3.7.4 Herdabilidades no sentido amplo

As herdabilidades foram estimadas segundo a expressão:

$$h_a^2 = \frac{\widehat{\sigma}_G^2}{\widehat{\sigma}_F^2}$$

Sendo:

h_a^2 = herdabilidade no sentido amplo;

$\widehat{\sigma}_G^2$ = variância genotípica na progênie F_2 ; e

$\widehat{\sigma}_F^2$ = variância fenotípica na progênie F_2 .

As herdabilidades, para a população F_2 , também foram calculadas através da regressão pai-filho, estimadas com o avanço desta para a geração F_3 , segundo SMITH e KINMAN (1965):

$$h^2 = \frac{\widehat{b}}{(1+F)}$$

em que,

F = coeficiente de endogamia da geração F₂;

$$\hat{b} = \text{coeficiente de regressão} = \frac{\text{Cov}(F_2, F_3)}{\sigma_{F_2}^2}$$

Cov (F₂, F₃) = covariância fenotípica entre F₂ e F₃;

$\sigma_{F_2}^2$ = variância fenotípica de F₂.

No intuito de minimizar o efeito das diferenças ambientais decorrentes da condução das gerações em épocas diferentes, as estimativas de herdabilidade também foram baseadas nos coeficientes de regressão padronizados (b_p) conforme o método proposto por FREY e HORNER (1957).

$$h^2 = \frac{b_p}{(1+F)}$$

em que,

F = coeficiente de endogamia da geração F₂;

$$b_p = \text{coeficiente de regressão padronizado} = \frac{\text{Cov}(F_2, F_3)}{\text{DP}(F_2) \cdot \text{DP}(F_3)};$$

Cov (F₂, F₃) = covariância fenotípica entre F₂ e F₃;

DP(F₂) = desvio-padrão fenotípico das plantas F₂;

DP(F₃) = desvio-padrão fenotípico das plantas F₃.

3.7.5 Ganho de seleção

Os ganhos esperados e realizados foram estimados utilizando-se das seguintes expressões:

$$\text{GP}(\%) = h^2 \cdot \text{DS} \cdot 100$$

$$\text{GR}(\%) = \frac{\bar{X}_{F_3}^S - \bar{X}_{F_2}}{\bar{X}_{F_2}} 100$$

em que:

GP = ganho predito em porcentagem;

GR = ganho realizado porcentagem;

h^2 = herdabilidade estimada;

DS = Diferencial de seleção = $(\bar{X}_{F_2}^S - \bar{X}_{F_2})$

\bar{X}_{F_2} = média da população F_2 ;

$\bar{X}_{F_2}^S$ = média dos indivíduos selecionados na população F_2 ; e

$\bar{X}_{F_3}^S$ = média dos indivíduos F_3 selecionados na população F_2 .

3.7.6 Divergência genética e *fingerprinting*

As relações genéticas entre A29, CS303TNKCA, Tucunaré, linhagens da COODETEC e indivíduos F_2 selecionados foram avaliadas por meio de uma matriz de dissimilaridade construída através das informações de marcadores moleculares co-dominante que foram descritas para cada acesso avaliado, na forma de representação genotípica, dadas em função do número de alelos por cada loco. A representação genotípica para formas homozigotas foram 11, 22 e 33 e para as heterozigotas 12, 13 e 23, se, por exemplo, o loco apresentou 3 alelos. As distâncias genéticas foram estimadas utilizando-se o complemento do índice ponderado ($D = 1 - S$) como medida de dissimilaridade, em que:

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

sendo:

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

a_j : número total de alelos do loco j

A : número total de alelos estudados

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

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

Na análise de divergência genética dos oito pais, com base na matriz de dissimilaridade genética gerada, foi aplicado o método de agrupamento de Tocher (RAO, 1952), construído dendrogramas pelos método de agrupamento do vizinho mais distante e o método de UPGMA. Foi feita a projeção de distância no plano, onde as medidas de dissimilaridade foram convertidas em escores relativos a duas variáveis X e Y , que, quando representadas em gráficos de dispersão, refletiram, no espaço bidimensional, nas distâncias

originalmente obtidas a partir do espaço n-dimensional (n = número de caracteres utilizados para obtenção das distâncias). Para o *fingerprinting* molecular da população F_2 em relação aos pais e linhagens da COODETEC foi feito agrupamento dos genótipos mais e menos similares, que leva em consideração apenas as distâncias genéticas dos indivíduos na matriz de dissimilaridade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises Biométricas

Os valores médios dos teores de ácidos graxos são apresentados na Tabela 1 e foram obtidos a partir da análise de seis sementes de cada uma de seis plantas dos progenitores A29 e CS303TNKCA. Da variedade Tucunaré foram analisadas seis sementes de cada uma de três plantas, totalizando 18 sementes. Foram avaliadas 271 sementes da população F_2 derivada do cruzamento AC e 239 sementes da população F_2 derivada do cruzamento AT. Observa-se que os progenitores são contrastantes para os teores de ácido linolênico. Sendo A29 e Tucunaré os progenitores que possuem maior discrepância para este ácido graxo. Com isso, a população formada através do cruzamento entre eles possui maiores valores máximo e mínimo para teores de ácido linolênico. As médias dos progenitores e populações F_2 demonstram que os mesmos não estão contrastando para os demais ácidos graxos analisados.

As distribuições dos teores de ácido linolênico nas populações F_2 , do cruzamento AC e AT, são apresentadas nas Figuras 3 e 4. Em geral, os teores de ácido linolênico das gerações F_2 foram distribuídos entre os teores dos progenitores. Entretanto, houve segregação transgressiva nas populações, pois menor teor de ácido linolênico do que o progenitor A29 foi encontrado na população AC e maior teor desse ácido do que o progenitor Tucunaré foi encontrado na população AT (Tabela 1). Isto indica que os progenitores possuem alelos em diferentes locos controlando o teor de ácido linolênico. Resultados semelhantes foram encontrados por RAHMAN e TAKAGI (1997) avaliando uma população F_2 do cruzamento entre M-5 e KL-8. Entretanto, RAHMAN *et al.* (1996) não encontraram segregação transgressiva para teor de ácido linolênico na população F_2 do cruzamento entre os genótipos mutados M-5 e C1640.

Tabela 1: Valores de média (\bar{X}), desvio padrão (DP), mínimo (MIN), máximo (MAX), para teores de ácidos graxos de A29, CS303TNKCA e das populações F₂ do cruzamento A29 x CS303TNKCA e do cruzamento A29 x Tucunaré.

Genótipos ou População		Ácido Graxo (%)				
		Palmitico	Esteárico	Oléico	Linoléico	Linolênico
A29	\bar{X}	11,0098	4,0729	21,7153	62,025	1,1918
	DP	0,4709	0,4524	3,2224	3,4127	0,175
	MIN	9,6633	3,0462	15,2175	54,6684	0,9046
	MAX	11,8824	5,1126	28,3297	69,8548	1,846
CS303TNKCA	\bar{X}	11,576	3,2178	16,0562	65,1879	3,9686
	DP	0,4664	0,291	2,4292	2,2595	0,5329
	MIN	10,4652	2,4854	13,1496	54,2572	3,265
	MAX	12,5639	3,9454	27,8636	68,4503	6,1657
Tucunaré	\bar{X}	11,4141	3,1096	19,1385	58,1758	7,9955
	DP	0,3573	0,2624	1,1934	0,8283	0,7281
	MIN	10,9114	2,7136	17,0758	56,5667	5,9995
	MAX	12,1736	3,6709	21,9578	59,3647	9,069
A29 x CS303TNKCA	\bar{X}	10,908	3,7594	21,5221	61,4356	2,3937
	DP	0,7336	0,7765	4,6023	4,4953	0,7487
	MIN	6,2373	0,1071	13,699	38,4802	0,3323
	MAX	12,6065	5,5346	45,4233	78,8159	4,1914
A29 x Tucunaré	\bar{X}	10,3280	3,6721	24,7417	57,0424	4,2106
	DP	1,4522	1,2803	4,3736	4,0183	1,5887
	MIN	0,6707	2,2731	9,6615	37,0618	0,9724
	MAX	14,2258	19,9735	47,8887	65,9157	12,9042

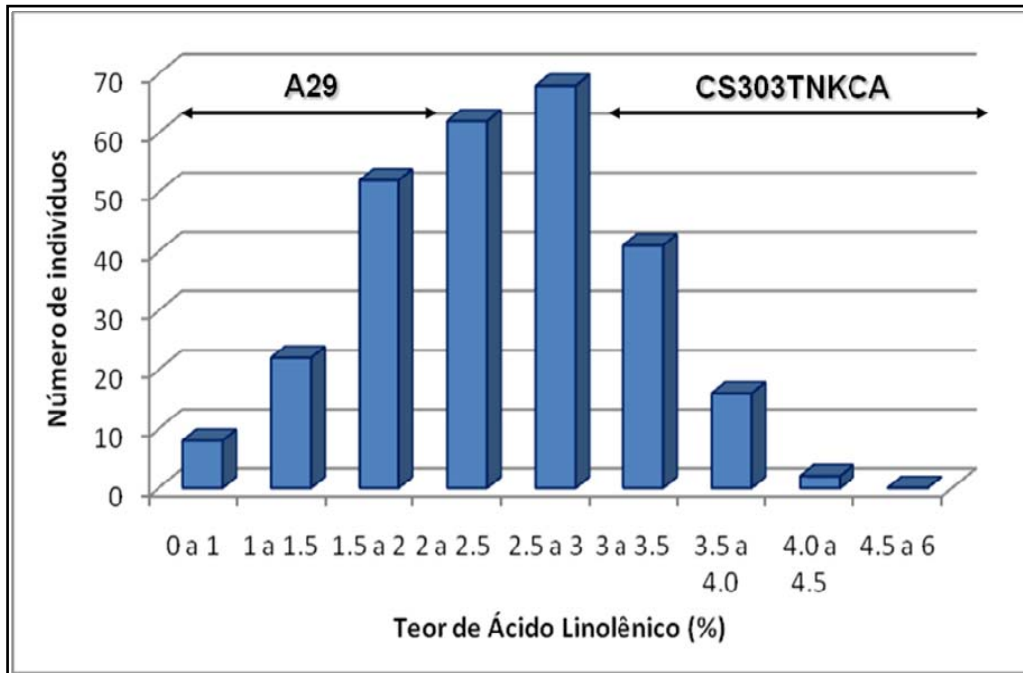


Figura 3: Distribuição de freqüência dos teores de ácido linolênico em sementes F₂ do cruzamento entre A29 x CS303TNKCA.

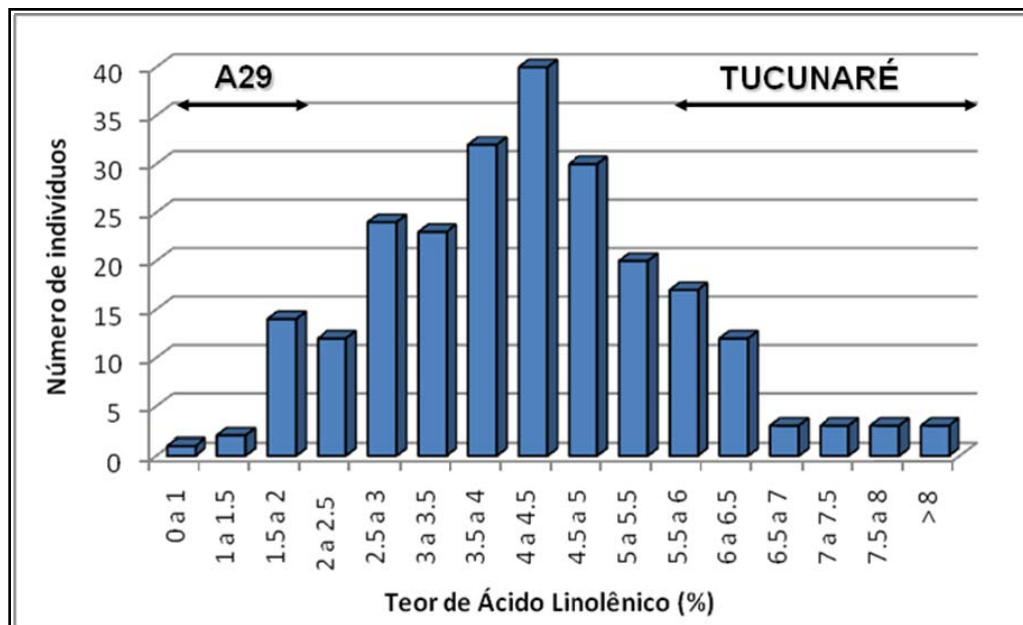


Figura 4: Distribuição de freqüência dos teores de ácido linolênico em sementes F₂ do cruzamento entre A29 x Tucunaré.

No cruzamento AT houve uma maior variabilidade na geração F₂, uma vez que foram utilizados indivíduos com maior contraste para teor de ácido linolênico. A menor variabilidade encontrada no cruzamento AC se explica

devido a maior proximidade dos teores de ácido linolênico de A29 e CS303TNKCA.

Cruzamentos envolvendo linhagens mutantes com teores modificados de ácidos graxos constataram herança simples para esta característica, possivelmente pela ação de genes maiores (STOJSIN *et al.*, 1998; PRIMOMO *et al.*, 2002; ANAI *et al.*, 2005). A produção de 1% de ácido linolênico no genótipo A29 é condicionada por três genes, designados de *GmFAD3-A*, *GmFAD3-B* e *GmFAD3-C* (FEHR e HAMMOND, 2000; ROSS *et al.*, 2000; BILYEU *et al.*, 2003; BILYEU *et al.*, 2006). GESTEIRA (1997), analisando a segregação do cruzamento de BARC-12, acesso que originou a isolinha CS303TNKCA, e CAC-1 concluiu que pelo menos dois genes são responsáveis pelo controle gênico do teor de ácido linolênico nesse cruzamento. Entretanto, cruzamentos entre parentais não mutantes tem demonstrado que a herança dos teores de ácidos graxos (mono e polinsaturados) é de natureza quantitativa (WHITE *et al.*, 1961; BURTON *et al.*, 1983; GRAEF *et al.*, 1988). Isso provavelmente explica a maior variabilidade encontrada na população F₂ oriunda de AT, já que Tucunaré é uma variedade comercial com teores normais de ácido linolênico.

As estimativas de média, variância fenotípica, ambiental e genotípica e herdabilidade, para os cinco caracteres, referentes às gerações F₂ são apresentados na Tabela 2. A variância fenotípica para o cruzamento AT foi maior do que a encontrada no cruzamento AC. Nos dois cruzamentos a variância genotípica explica quase toda a variância fenotípica encontrada.

O caráter teor de ácido linolênico apresentou estimativas de herdabilidades altas, aproximadamente, 72% e 89% nas populações F₂ derivadas do cruzamento AC e AT, respectivamente. Os valores estimados concordam com aqueles obtidos por GESTEIRA *et al.* (2003), que encontraram valores de herdabilidade de 75% para essa característica. Segundo FALCONER (1987), os caracteres com estimativas de herdabilidade acima de 50% indicam que as contribuições das causas genéticas são mais pronunciadas do que as atribuídas a fatores do ambiente, na expressão fenotípica do caráter. STREIT *et al.* (2001), trabalhando com quatro populações F₂ de soja, obtiveram estimativas de herdabilidade de 48% para ácido linolênico, variando entre as populações de 28 a 80%.

Tabela 2: Média (\bar{X}), variâncias fenotípicas ($\hat{\sigma}_F^2$), de ambiente ($\hat{\sigma}_E^2$) e genotípicas ($\hat{\sigma}_G^2$) e herdabilidades no sentido amplo (h_a^2) para os teores de ácido graxo estudadas nas populações F₂.

População F ₂		Ácido Graxo				
		Palmítico	Estearíco	Oléico	Linoléico	Linolênico
A29 x CS303TNKCA	\bar{X}	10,9080	3,7593	21,5221	61,4356	2,3937
	$\hat{\sigma}_F^2$	0,5381	0,6030	21,1812	20,2080	0,5605
	$\hat{\sigma}_E^2$	0,2196	0,1447	8,1424	8,3759	0,1573
	$\hat{\sigma}_G^2$	0,3185	0,4583	13,0389	11,8320	0,4032
	h_a^2	0,5919	0,7600	0,6157	0,5855	0,7194
A29 x Tucunaré	\bar{X}	10,3280	3,6721	24,7417	57,0424	4,2106
	$\hat{\sigma}_F^2$	2,1087	1,6392	19,1288	16,1464	2,5238
	$\hat{\sigma}_E^2$	0,1747	0,1368	5,9039	6,1664	0,2804
	$\hat{\sigma}_G^2$	1,9340	1,5024	13,2249	9,9800	2,2434
	h_a^2	0,9171	0,9166	0,6914	0,6181	0,8889

O cruzamento AC apresentou herdabilidades altas para os demais ácidos graxos avaliados, o menor e o maior valor encontrado foi para o ácido linoléico (58%) e esteárico (76%), respectivamente. Dados semelhantes foram encontrados por PANTHEE *et al.* (2006) que obtiveram estimativas de herdabilidades variando de 65 a 77% entre os cinco ácidos graxos produzidos na semente de soja.

No cruzamento AT a herdabilidade dos ácidos palmítico e esteárico foi de, aproximadamente, 92%. Para os demais ácidos graxos avaliados a menor herdabilidade encontrada foi 62% para o teor de ácido linoléico. Porém, STREIT *et al.* (2001) obtiveram estimativas de herdabilidade, com base na média, de 44% para ácido palmítico, variando de 20% a 64%, entre as populações estudadas.

As estimativas de herdabilidade obtidas indicam que, nas duas populações em estudo, existe potencial para realizar a seleção em gerações precoces para a redução do teor de ácido linolênico, facilitando a condução de

um programa de melhoramento que visa à modificação da composição de ácidos graxos do óleo de soja.

Na Tabela 3 são apresentados as médias e variâncias dos 30 indivíduos selecionados para baixo teor de ácido linolênico nas populações F_2 , a média e variâncias dos mesmos indivíduos selecionados nas populações F_3 , os valores estimados de herdabilidade segundo as metodologias de SMITH e KINMAN (1965) e FREY e HORNER (1957), por meio da regressão de F_2 sobre F_3 , para os caracteres estudados dentro de cada cruzamento.

No cruzamento AC a seleção direta para baixo teor de linolênico na população F_2 promoveu médias superiores na população F_3 para todos os ácidos graxos, exceto para o ácido oléico. No cruzamento AT também foram verificadas médias superiores em F_3 , exceto para os ácidos esteárico e oléico. Isso pode ter ocorrido devido a dificuldades para manter a temperatura na casa de vegetação durante a condução da geração F_3 , variações de temperatura tendem a alterar a composição dos ácidos graxos. LANNA *et al.* (2005) trabalhando com a variedade CAC-1 e a linhagem CC4 cultivadas em ambientes com temperaturas variando de 34/28°C e 22/13°C, obtiveram conteúdos de ácido linolênico de 3,89 e 6,92% para linhagem CC4 e 7,39 e 12,49% para variedade CAC-1 quando cultivadas em alta e baixa temperatura, respectivamente. BYFIELD e UPCHURCH (2007b) estudando o efeito de temperatura nos três locos independentes que controlam a produção de ácido linolênico em soja, designados de *GmFAD3-A*, *GmFAD3-B* e *GmFAD3-C*, observaram diminuição da expressão gênica e conseqüente redução de 39 a 50% no teor de ácido linolênico de três variedades de soja examinadas em ambientes com temperatura de 30 a 26°C. BYFIELD e UPCHURCH (2007a) avaliando a acumulação e transcrição de ω -6 dessaturase microssomal e delta-9 estearol-ACP concluíram que a temperatura modula os teores de ácido oléico e linoléico no desenvolvimento de sementes através da regulação da expressão gênica de FAD2-1, mas a temperatura de modulação do conteúdo de ácido esteárico pode ser mais complexa, pois envolve a expressão de outros genes.

Tabela 3: Médias ($\bar{X}_{F_2}^s$) e variâncias fenotípicas ($\sigma_{F_2}^2$) dos indivíduos selecionados nas populações F_2 ; média ($\bar{X}_{F_3}^s$) e variâncias fenotípicas ($\sigma_{F_3}^2$) dos mesmos indivíduos selecionados nas populações F_3 , estimativas de herdabilidades segundo as metodologias de SMITH e KINMAN (h_{SK}^2) e FREY e HORNER (h_{FH}^2) para os teores de ácido graxo.

População F_2		Ácido Graxo				
		Palmítico	Estearico	Oléico	Linoléico	Linolênico
A29 x CS303TNKCA	$\bar{X}_{F_2}^s$	10,619	3,11	24,138	60,984	1,149
	$\bar{X}_{F_3}^s$	11,414	3,3	17,128	66,178	1,981
	$\sigma_{F_2}^2$	1,9797	1,3257	38,7034	52,9062	0,1191
	$\sigma_{F_3}^2$	0,4094	0,149	1,4835	2,2067	0,7331
	h_{SK}^2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	h_{FH}^2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
A29 x Tucunaré	$\bar{X}_{F_2}^s$	10,218	3,656	26,258	57,915	1,953
	$\bar{X}_{F_3}^s$	11,162	3,196	18,082	65,021	2,539
	$\sigma_{F_2}^2$	4,4544	0,2849	10,6217	11,242	0,1867
	$\sigma_{F_3}^2$	0,3208	0,1464	3,2166	2,1458	0,6519
	h_{SK}^2	0,1167	0,3907	0,0919	0,0137	1,0613
	h_{FH}^2	0,4349	0,5451	0,1671	0,0314	0,5679

Nas duas populações as variâncias fenotípicas em F_2 foram superiores a geração F_3 , exceto para teores de ácido linolênico. Como se trata de indivíduos aparentados a covariância é função apenas da variância genética, não envolvendo o componente ambiental (COCKERHAM, 1963). Isto porque os ambientes das plantas F_2 e F_3 são não correlacionados, o que significa que a covariância de ambiente entre F_2 e F_3 será nula.

No cruzamento AC, as estimativas de herdabilidade segundo as duas metodologias de regressão pai-filho foram, em geral, baixas. Tal fato ocorreu provavelmente, devido à geração F_3 ter sido oriunda apenas de indivíduos selecionados em F_2 . Além da alta intensidade de seleção aplicada em F_2 , tornando baixa a variância genética presente, considerando ainda a baixa

variabilidade genética entre os progenitores para as características avaliadas (Tabela 1). Outro fator que pode ter ocasionado os baixos valores de herdabilidade obtidos, pode ter sido devido a grande influência da temperatura na condução da geração F₃.

A população AT apresentou coeficiente de herdabilidade inferior a 50% para os ácidos graxos estudados, exceto para os ácidos esteárico e linolênico (Tabela 3). Utilizando a metodologia de SMITH e KINMAN (1965) a herdabilidade para o ácido linolênico apresentou valor superior à unidade, superestimando os valores calculados para o coeficiente de regressão (CARVALHO, 1981). Isto ocorreu, provavelmente, devido à interação genótipo x ambiente, efeito da temperatura, contribuir diretamente na manifestação do caráter obtendo resultados não esperados. Para corrigir problemas como este FREY e HORNER (1957) consideram que o uso da transformação dos dados obtidos em unidades de desvio padrão pode ser utilizado com grande efeito. A estimativa de herdabilidade obtida, segundo a metodologia proposta por estes autores, foi mais adequada para o teor de ácido linolênico (56%) do que a estimativa obtida pelo método de SMITH e KINMAN (1965). STOJSIN *et al.* (1998) estimaram a herdabilidade segundo a metodologia de FREY e HORNER (1957) e obtiveram valores altos para teores de ácido linolênico nas duas populações estudadas (83 e 90%).

GRAEF *et al.* (1988) e FEHR *et al.* (1992) obtiveram resultados de herdabilidade para teor de ácido linolênico nos cruzamentos examinados, 88 e 74%; e 88 e 80%, respectivamente. REBETZKE *et al.* (1997), trabalhando com cruzamento entre N87-2122-4 com três materiais de *G. soja*, obtiveram altas estimativas de herdabilidade para o ácido palmítico (67 a 98%) e linoléico (44 a 80%) e menores herdabilidades para oléico (36 a 66%) e linolênico (10 a 47%). CHERRAK *et al.* (2003), estimando a herdabilidade através da regressão pai-filho, encontraram valores para ácido palmítico de 65% e para ácido linolênico de 73%. ALT *et al.* (2005), trabalhando com uma população F₂ oriunda do cruzamento entre M23 (mutante para baixo teor de ácido oléico) e Archer (variedade com teores normais), encontraram herdabilidade para ácido linolênico de 44%.

É importante destacar que uma estimativa de herdabilidade refere-se a uma característica de uma população e é específica para as condições

experimentais nas quais os genótipos foram estudados. Logo, é difícil generalizar estimativas de uma população para outra, ou para diferentes condições experimentais (DUDLEY e MOLL, 1969).

Na Tabela 4 são apresentados os dados referentes as herdabilidades no sentido amplo (h_a^2), diferencial de seleção da população F_2 (DS), média dos indivíduos selecionados em F_2 na geração F_3 ($\bar{X}_{F_3}^s$), ganho predito (GP), ganho predito percentual (GP%) e ganho realizado devido a seleção (GR%) para teores de ácido linolênico nas duas populações estudadas.

As previsões de ganhos para teor de ácido linolênico foram maiores na população AT do que na população AC. Pode-se observar que o cruzamento AT também apresentou maior ganho predito e realizado, em face desta população apresentar maior variabilidade genética.

Embora o cruzamento AC tenha apresentado magnitudes diferentes entre ganho predito e realizado, o sentido do ganho não foi alterado. Isso pode ser explicado pelas diferentes condições ambientais em que foi conduzida a população para predição de ganhos e a população para obtenção do ganho realizado.

VENCOVSKY (1987) salienta que esse é um dos fatores que podem afetar a comparação entre ganho predito e ganho realizado. Outro fator que pode ter contribuído para o baixo ganho realizado na população do cruzamento AC foi a baixa divergência entre os progenitores para o caráter analisado, quando comparado com cruzamento AT, gerando uma menor variabilidade na população de estudo.

Entretanto, no cruzamento AT houve uma maior dificuldade de selecionar indivíduos com baixos teores de ácido linolênico do que no cruzamento AC. No primeiro cruzamento foram selecionados 30 indivíduos com teores de ácido linolênico abaixo de 2,5%, enquanto, no segundo cruzamento foram selecionados 30 indivíduos com teores desse ácido abaixo de 1,5%.

Tabela 4: Herdabilidades no sentido amplo (h_a^2), média da população F_2 (\bar{X}_{F_2}), média dos indivíduos selecionados em F_2 ($\bar{X}_{F_2}^s$), diferencial de seleção da população F_2 (DS), média dos indivíduos selecionados em F_2 na geração F_3 ($\bar{X}_{F_3}^s$), ganho predito (GP), ganho predito percentual (GP%) e ganho realizado (GR%) para teores de ácido linolênico nas duas populações estudadas.

População	h_a^2	\bar{X}_{F_2}	$\bar{X}_{F_2}^s$	DS	$\bar{X}_{F_3}^s$	GP	GP%	GR%
AC	0,7194	2,3937	1,1156	-1,2781	1,981	-0,9194	-38,4117	-17,8677
AT	0,8889	4,2106	1,9532	-2,2573	2,539	-2,0065	-47,6547	-39,6998

AC – cruzamento entre A29 c CS303TNKCA; AT – cruzamento entre A29 x Tucunaré.

Analisando as magnitudes das correlações fenotípicas e genotípicas (Tabela 5), verificou-se que as correlações genotípicas superaram as fenotípicas em 90% dos casos para o cruzamento AC e em 80% dos casos para o cruzamento AT. Esses resultados indicam que os fatores genéticos expressam maior influência que os fatores ambientais, tendo pelo menos um dos caracteres envolvidos apresentando alta herdabilidade (BACKES *et al.*, 2003).

Embora as correlações possam ser estudadas, quanto à magnitude, deve-se dar atenção particular ao estudo das correlações significativas. No cruzamento AC, verificou-se que 50% das correlações fenotípicas foram significativas a 1% de probabilidade. Nas populações F_2 do cruzamento AT observou-se que 60% das correlações fenotípicas foram significativas a 1% de probabilidade, e 10% foram significativas a 5%. As correlações genotípicas e ambientais não foram avaliadas a nível de significância.

Das correlações fenotípicas encontradas nas duas populações são importantes, para o presente trabalho, aquelas encontradas entre o teor de ácido linolênico e os demais ácidos graxos. As duas populações estudadas apresentaram correlação positiva e significativa entre o ácido linolênico e esteárico. Observa-se que houve correlação fenotípica negativa entre o ácido linolênico e o ácido oléico no cruzamento AC.

No cruzamento AT foram significativas e negativas as correlações entre o ácido linolênico e os ácidos oléico e linoléico. Correlações fenotípica entre o ácido palmítico e linolênico não foram encontradas em nenhuma das

populações estudadas. Resultados semelhantes foram encontrados por PRIMONO *et al.* (2002), trabalhando com seis populações F₂, nas quais observaram correlações significativas positivas entre ácido linolênico e esteárico, e negativas com ácido oléico e linoléico, entretanto, não obteve nenhuma correlação entre os ácidos linolênico e palmítico. ALT *et al.* (2005) encontraram correlação fenotípica negativa e significativa entre os ácidos linolênico e oléico.

As correlações fenotípicas e genotípicas entre os ácidos graxos não apresentaram inversão de sinal em nenhuma das populações estudadas. Tais inversões, quando ocorrem, podem ser decorrentes de erros de amostragem (CRUZ e REGAZZI, 2004). Nos dois cruzamentos estudados houve considerável inversão de sinais entre as correlações genéticas e ambientais. FALCONER (1987) considera essas inversões um indicativo de que a variação genética e o efeito ambiental influenciam os caracteres por meio de mecanismos fisiológicos diferentes.

Tabela 5: Estimativas de coeficientes de correlação fenotípica (r_F), genotípica (r_G) e ambiental (r_E) entre os teores de ácido graxo mensurados nas duas populações F₂.

Ácido Graxo	A29 x CS303TNKCA			A29 x Tucunaré		
	r_F	r_G	r_E	r_F	r_G	r_E
PAL x EST	0,3435**	0,5473	-0,0757	-0,1072	-0,1077	-0,0904
PAL x OLE	0,0903	0,1712	-0,0330	-0,1745**	-0,2435	0,1039
PAL x LEI	-0,3286**	-0,4763	-0,1173	-0,1623*	-0,1559	-0,2127
PAL x LEN	0,1096	0,1843	-0,0315	0,0609	0,0820	-0,1561
EST x OLE	-0,3764**	-0,6245	0,1670	-0,3593**	-0,4729	0,0882
EST x LEI	0,095	0,2609	-0,2506	0,036	0,1136	-0,2257
EST x LEN	0,4006**	0,6243	-0,2353	0,1892**	0,2165	-0,0713
OLE x LEI	-0,9359**	-0,9110	-0,9744	-0,8062**	-0,7298	-0,7524
OLE x LEN	-0,2521**	-0,2852	-0,1898	-0,2584**	-0,2892	-0,1821
LEI x LEN	0,0108	-0,0277	0,0844	-0,1957**	-0,2973	0,1257

**,* - significativo a 1 e 5%, respectivamente; PAL – ácido palmítico; EST – ácido esteárico; OLE – ácido oléico; LEI – ácido linoléico; LEN - ácido linolênico.

Divergência genética e *fingerprinting*

Neste estudo de avaliação da divergência genética via marcadores microssatélite, foram considerados apenas *primers* que geraram pelo menos uma banda polimórfica entre os oito progenitores avaliados. Na Figura 5 é apresentado um gel de poliacrilamida 10% dos produtos de amplificação de DNA utilizando o *primer* Satt345.

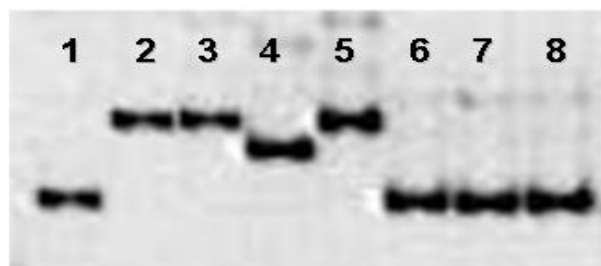


Figura 5. Análise eletroforética dos produtos de amplificação do *primer* Satt345 nos oito genótipos em gel de poliacrilamida 10%. Genótipos: (1) A29; (2) CS303TNKCA; (3) Tucunaré; (4) CD01RR; (5) CD222; (6) CD224; (7) CD225RR; (8) CD219RR.

Na Tabela 6 são apresentadas às distâncias genéticas obtidas, usando o complemento do índice ponderado ($D=1-S$), entre os oito progenitores estudados. A menor distância genética encontrada (0,41) foi entre os genótipos CD225RR e CD219RR, que são variedades da COODETEC que serão utilizadas como progenitores recorrentes no programa de melhoramento da qualidade da soja do BIOAGRO/UFV. A similaridade encontrada pode ser explicada pela genealogia comum dessas linhagens. As maiores dissimilaridades encontradas foram entre a linhagem doadora de alelos para baixíssimos teores de linolênico (A29) com a variedade Tucunaré (0,78) e com a isolinha CS303TNKCA (0,74). Esses resultados demonstram que existe diversidade genética entre estes progenitores sendo importantes para um programa de introgressão de alelos para baixos teores de linolênico.

As linhagens da COODETEC apresentaram menores distâncias entre si, e maiores distância em relação a A29, CS303TNKCA e Tucunaré, mostrando potencial para serem utilizadas em um programa de retrocruzamento iniciado com populações F_2 oriundas dos cruzamentos entre estes progenitores.

Tabela 6: Matriz das dissimilaridades genéticas obtidas pelo complemento do índice ponderado ($D=1-S$), com base em 65 marcadores SSR, entre os oito progenitores utilizados no programa para introgressão de alelos para baixo teor de ácido linolênico.

Progenitores	1	2	3	4	5	6	7	8
A29	1	0						
CS303	2	0,74	0					
Tucunaré	3	0,78	0,71	0				
CD01RR	4	0,67	0,60	0,70	0			
CD222	5	0,67	0,65	0,70	0,58	0		
CD224	6	0,64	0,71	0,64	0,61	0,61	0	
CD225RR	7	0,69	0,71	0,72	0,54	0,58	0,59	0
CD219RR	8	0,67	0,58	0,53	0,66	0,63	0,45	0,41

Os acessos foram agrupados a partir da matriz de dissimilaridade utilizando o método de otimização de Tocher, o método UPGMA, e o método do vizinho mais distante. O dendrograma obtido pelo método do UPGMA permitiu a formação de quatro grupos com as seguintes constituições: grupo 1 formado pelas cinco linhagens da COODETEC (CD225RR, CD219RR, CD224, CD01RR, CD222), o grupo 2 formado pela isolinha CS303TNKCA, o grupo 3 formado pela variedade Tucunaré, e o grupo 4 formado pelo genótipo A29 (Figura 6). No método do vizinho mais distante houve a formação de dois grupos, sendo o grupo 1 formado pelas três linhagens da COODETEC (CD225RR, CD219RR e CD224) e o progenitor A29, o grupo 2 por duas linhagens da COODETEC (CD01RR e CD222), a isolinha CS303TNKCA e a variedade Tucunaré (Figura 7). O método de Tocher possibilitou a formação de quatro grupos: o primeiro grupo formado por CD225RR, CD219RR, CD224, CD01RR e CD222, e os demais grupos formados pelos progenitores CS303TNKCA, Tucunaré e A29 isoladamente (Figura 8). Os métodos de Tocher e UPGMA formaram grupos com os mesmos indivíduos e foram os que possibilitaram maior diferenciação entre os progenitores (Tabela 7).

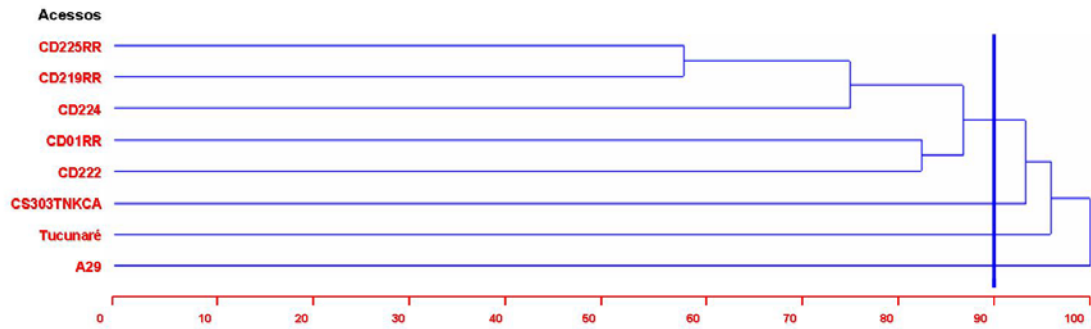


Figura 6: Dendrograma obtido pelo método UPGMA com base nas medidas de dissimilaridade entre os acessos de soja: A29, CS303TNKCA, Tucunaré, CD01RR, CD222, CD224, CD225RR, CD219RR.

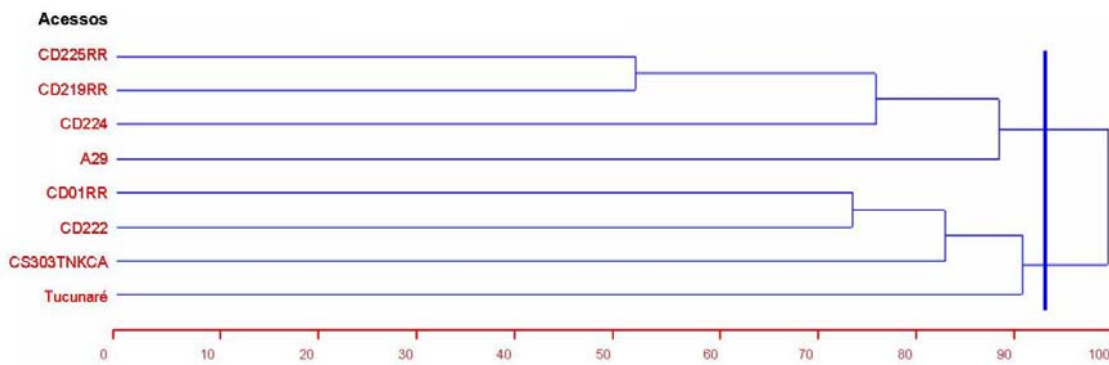


Figura 7: Dendrograma obtido pelo método do vizinho mais distante com base nas medidas de dissimilaridade entre os acessos de soja: A29, CS303TNKCA, Tucunaré, CD01RR, CD222, CD224, CD225RR, CD219RR.

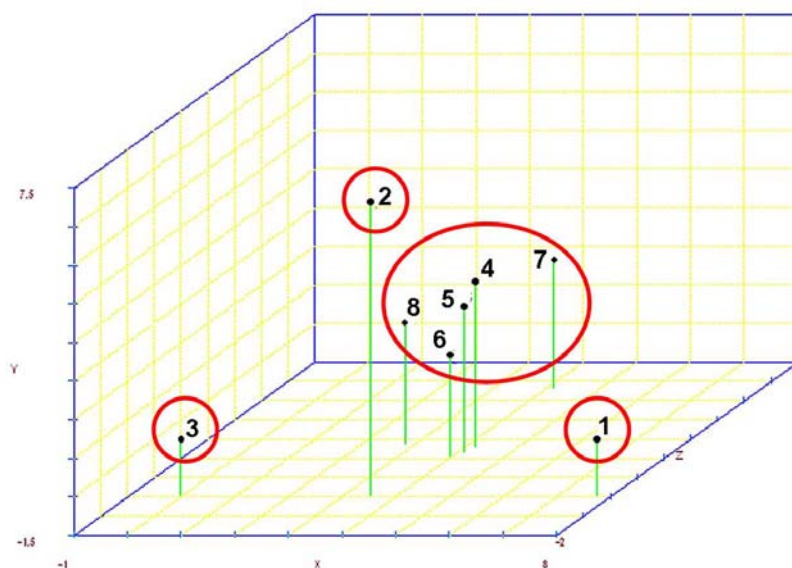


Figura 8: Projeções das distâncias no espaço com base na matriz de dissimilaridades obtida pelo complemento do índice ponderado. Os genitores agrupados por meio das elipses correspondem aos grupos formados pelo método de otimização de Tocher. Os números indicam os genótipos: (1) A29; (2) CS303TNKCA; (3) Tucunaré; (4) CD01RR; (5) CD222; (6) CD224; (7) CD225RR e (8) CD219RR. Stresse: 38,61 %. Correlação entre distâncias originais e estimadas: 0,68.

Tabela 7: Comparação entre os métodos de agrupamento de Tocher, UPGMA e vizinho mais distante dos oito progenitores.

Grupos	Tocher	UPGMA	Vizinho mais distante
1	CD225RR, CD219RR, CD224, CD01RR, CD222	CD225RR, CD219RR, CD224, CD01RR, CD222	CD225RR, CD219RR, CD224, A29
2	CS303TNKCA	CS303TNKCA	CD01RR, CD222, CS303TNKCA, Tucunaré
3	Tucunaré	Tucunaré	
4	A29	A29	

Com intuito de identificar os indivíduos das populações estudadas que fossem mais próximos das linhagens da COODETEC, que serão utilizados como progenitores recorrentes no programa de melhoramento da qualidade da soja do BIOAGR/UFV, foram utilizados marcadores microssatélites que fossem polimórficos entre os pais (A29 x CS303TNKCA e A29 x Tucunaré) e que apresentassem o mesmo padrão de bandas dos futuros progenitores recorrentes. Essa estratégia foi utilizada para reduzir o número de retrocruzamentos para recuperação do genótipo do progenitor recorrente durante o programa. Na Figura 9 é apresentado uma análise eletroforética dos produtos de amplificação do *primer* Satt191 na população F₂ oriunda do cruzamento AC e dos progenitores que deverão ser utilizados como recorrente na próxima fase.

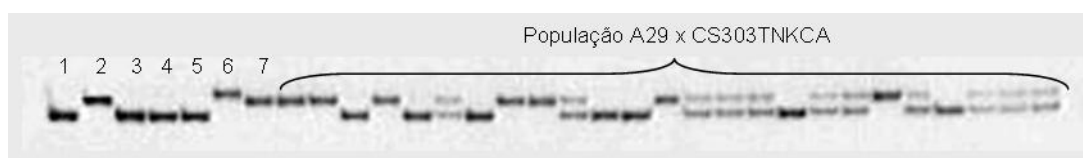


Figura 9: Análise eletroforética dos produtos de amplificação do *primer* Satt191 na população A29 x CS303TNKCA em gel de poli-acrilamida 10%. Genótipos: (1) A29; (2) CS303TNKCA; (3) CD01RR; (4) CD222; (5) CD224; (6) CD225RR; (7) CD219RR.

Para identificação dos indivíduos mais próximos dos futuros progenitores recorrentes utilizou-se o método de agrupamento do genótipo mais e menos similar, baseado apenas nas distâncias genéticas entre os indivíduos. Os indivíduos mais próximos das linhagens da COODETEC e que tiveram seu baixo teor de ácido linolênico confirmados em F₃ foram selecionados (Tabela 8). Nota-se que houve indivíduos selecionados para mais de um progenitor recorrente. O indivíduo 5, por exemplo, foi escolhido para todas as linhagens da COODETEC. HOSPITAL *et al.* (1992), através de simulações, demonstraram que a utilização de marcadores moleculares pode levar a um ganho de tempo, de no mínimo, duas gerações.

Tabela 8: Indivíduos da população F₂ do cruzamento entre A29 x CS303TNKCA selecionados pela similaridade genética em relação às linhagens da COODETEC e teor de ácido linolênico.

Linhagens COODETEC	Indivíduos Selecionados	Similaridade	Teor de Ácido Linolênico em F₃
CD01RR	5	0,73	1,3145
	6	0,54	1,4135
	32	0,54	1,0599
	4	0,50	1,4625
CD222	5	0,64	1,3145
	4	0,50	1,4625
	31	0,50	0,9174
	32	0,45	1,0599
CD224	32	0,60	1,0599
	14	0,55	1,1034
	5	0,50	1,3145
	20	0,45	1,3426
CD225RR	5	0,68	1,3145
	4	0,59	1,4625
	6	0,54	1,4135
	32	0,50	1,0599
CD219RR	4	0,68	1,4625
	6	0,59	1,4135
	5	0,54	1,3145
	14	0,50	1,1034

Na figura 10 é apresentado um gel de poliacrilamida 10% dos produtos de amplificação do *primer* Satt279 na população F₂ oriunda do cruzamento entre AT e dos progenitores que deverão ser utilizados como recorrente nas etapas subseqüentes do programa.



Figura 10: Análise eletroforética dos produtos de amplificação do *primer* Satt279 na população A29 x Tucunaré em gel de poliacrilamida 10%. Genótipos: (1) A29; (2) Tucunaré; (3) CD01RR; (4) CD222; (5) CD224; (6) CD225RR; (7) CD219RR.

Na população F₂ do cruzamento entre AT houve semelhança nos indivíduos selecionados em relação às linhagens da COODETEC, como por exemplo, os indivíduos 21 e 10 que foram selecionados para efetuar cruzamentos com todos os futuros progenitores recorrentes (Tabela 9).

A semelhança de indivíduos selecionados, nas duas populações estudadas, para as linhagens da COODETEC confirma a proximidade genética entre estes progenitores (Tabela 7). Isso pode ser explicado pela relativa proximidade do *background* genético dessas linhagens que serão utilizadas como recorrentes no programa.

As plantas selecionadas, por meio da similaridade e confirmação de baixo teor de ácido linolênico em F₃, foram cruzadas com as linhagens da COODETEC e autofecundadas para dar início ao programa de retrocruzamentos.

Tabela 9: Indivíduos selecionados na população F₂ do cruzamento entre A29 x CS303TNKCA, similaridade genética em relação às linhagens da COODETEC e teor de ácido linolênico.

Linhagens COODETEC	Indivíduos Selecionados	Similaridade	Teor de Ácido Linolênico em F₃
CD01RR	21	0,50	1,9653
	9	0,42	1,5066
	10	0,42	1,3398
	11	0,42	1,2360
CD222	10	0,73	1,3398
	11	0,65	1,2360
	24	0,58	1,9975
	21	0,46	1,9653
CD224	10	0,73	1,3398
	9	0,54	1,5066
	21	0,50	1,9653
	11	0,46	1,2360
CD225RR	21	0,62	1,9653
	10	0,50	1,3398
	12	0,46	1,2371
	9	0,42	1,5066
CD219RR	10	0,69	1,3398
	21	0,58	1,9653
	11	0,50	1,2360
	12	0,50	1,2371

5. CONCLUSÕES

Os resultados permitem apontar as seguintes conclusões:

1. As altas herdabilidade das populações F_2 para teor de ácido linolênico indicam que estas populações são adequadas para se obter ganhos para baixo teor de ácido linolênico, e que a seleção pode ser efetuada em gerações precoces favorecendo o processo de retrocruzamento;
2. Somente a população F_2 do cruzamento entre A29 x Tucunaré apresentou herdabilidade acima de 50%, quando estimada por meio da regressão pai/filho em um conjunto de indivíduos selecionados;
3. Apesar da população F_2 do cruzamento entre A29 x Tucunaré apresentar maior ganho predito e realizado devido à alta variabilidade genética desta população, os 30 indivíduos selecionados apresentam teores de ácido linolênico abaixo de 2,5%;
4. As diferentes condições ambientais de condução das populações F_2 e F_3 do cruzamento entre A29 x CS303TNKCA promoveram baixo ganho realizado;
5. O estudo da divergência genética, por meio de marcadores moleculares do tipo microssatélite, evidenciou que os progenitores são divergentes entre si, sendo o genótipo A29, doador de alelos para baixíssimos teores de linolênico, o mais divergente. Entretanto, as linhagens da COODETEC foram similares entre si, devido à proximidade do *background* genético dessas linhagens;
6. O *fingerprinting* de DNA possibilitou a identificação dos indivíduos mais similares em relação às linhagens da COODETEC, no intuito de reduzir o número de retrocruzamentos para recuperação do genoma destes progenitores recorrentes. Nas duas populações F_2 estudadas foi possível selecionar quatro indivíduos mais próximos das linhagens da COODETEC e que confirmam baixos teores de ácido linolênico na geração F_3 .

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOOR, R.V. **Uso de marcadores moleculares na avaliação da diversidade genética em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1994. 53f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ABDELNOOR, R.V.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.18, p.265-273, 1995.

AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; CREGAN, P. B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v.132, p.1131-1139, 1992.

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo. Edgard Bliicher, 1971. 381p.

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

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.

AUGUSTO, M. M. M. **Obtenção e Caracterização de um Concentrado de Tocoferóis (vitamina E) a partir do Destilado da Desodorização do Óleo de Soja**. Campinas: UNICAMP, 1988. Dissertação (Mestrado de Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

BACKES, R. L.; REIS, M. S.; CRUZ, C. D.; SEDIYAMA, T.; SEDIYAMA, C. S. Correlation estimates and assessment of selection strategies in five soybean population. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.3, p.107-116, 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.

- 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 **Journal Crop Science**, v.43, p.1833-1838, 2003.
- BRAVO, J. J.; FEHR, W. R.; WELKE, G. A.; HAMMOND, E. G.; CIANZIO, S. R. Family and line selection for elevated palmitate in soybean. **Crop Science**, v.39, p.679-682, 1999.
- BUBECK, D.M.; FEHR, W.R.; HAMMOND, E.G. Inheritance of palmitic and stearic acid mutants of soybean. **Crop Science**, v.29, p.652-656, 1989.
- BURTON, J. W. Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Field Crops Research**, v.53, p.171-186, 1997.
- BURTON, J. W.; WILSON, R. F.; BRIM, C.A. Recurrent selection in soybeans. IV. Selection for increased oleic acid percentage in seed oil. **Crop Science**, v.23, p.744-747, 1983.
- 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.(RESEARCH)(Report). **Crop Science**, v.47, p.1698-1704, 2007a.
- BYFIELD, G. E.; UPCHURCH, R. G. Effect of temperature on microsomal omega-3 linoleate desaturase gene expression and linolenic acid content in developing soybean seeds.(RESEARCH)(Technical report). **Crop Science**, v.47, p.2445-2452, 2007b.
- BYRUM, J.R.; KINNEY, A.J.; STECCA, K.L.; GRACE; D.J.; DIERS, D B.W. Alteration of the omega-3 fatty acid desaturase gene is associated with reduced linolenic acid in the A5 soybean genotype. **Theor. Appl. Genet**, v.94, p.356-359, 1997.
- CARVALHO, F. I. F.; UITDEWILLIGEN, W. P. M.; FEDERIZZI, L. C.; GOMES, E. P.; PFEIFER, A. B.; MATOS, M. A. O. Herdabilidade do caráter estatura de planta de trigo: estimativa através do coeficiente de regressão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.16, n.1, p.55-67, 1981.
- CARVER, B. F.; BURTON, J. W., BRIM, C.A. Cumulative response to various recurrent selection schemes in soybeans: oil quality and correlated. **Crop Science**, v.26, p.853-858, 1986.
- CHAPELL, A.S.; BILYEU K.D. A GmFAD3A mutation in the low linolenic acid soybean line C1640. **Plant Breed**, v.125, p.535-536, 2006.
- CHERRAK, C.M.; PANTALONE, V.R.; MEYER, E.J.; ELLIS, D.L.; MELTON, S. L.; WEST, D.R.; and MOUNT J.R. Low-palmitic, low-linolenic soybean development **JAOCs**, v.80, n.6, p.539-543, 2003.
- COCKERHAM, C. C. Estimation of genetic variances. *In*: HANSON, W. D. e ROBINSON, H. F. **Statistical Genetics and Plant Breeding**, Madison: National Academy of Sciences. p.53-94.,1963.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Indicadores agropecuários: estimativas 2007**. Disponível em: www.conab.gov.br. Acessado em: Novembro de 2007.

CREGAN, P. B.; JARVIK, T.; BUSH, A. L.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G. KAHLER, A. L.; VAN TOAI, T. T.; LOHNES, D. G.; CHUNG, J.; SPECHT, J. E. An integrated genetic linkage map of soybean. **Crop Science**, v.39, p.1464-1490, 1999.

CRUZ, C. D. **Programa Genes**: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Editora UFV, 2001. 648p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 480p.

DIWAN, N.; CREGAN, P. B. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. **Theor. Appl. Gent.**, v.95, p.723-733, 1997.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

DUDLEY, J. M.; MOLL, R. H. Interpretation and use of estimates of heritability and genetics variances in plant breeding. **Crop Science**., v.9, n.3, p.257-262, 1969.

DUNTON, H. J.; LANCASTER, C. R.; EVANS, C. D.; COWAN, J. C. The flavor problem of soybean oil VII. Linolenic acid. **J. Am. Oil Chem. Soc**, v.28, p.115-118, 1951.

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

EYCHENNE, V.; MOULOUGUI, Z.; GASET, A. Thermal behavior of neopentylpolyol esters Comparison between determination by TGA-DTA and flash point. **Thermochim. Acta**, v.320, p.201-208, 1998.

FALCONER, D. S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa, UFV, Imprensa Universitária, 1987. 287p.

FEHR, W. R. Breeding for Modified Fatty Acid Composition in Soybean. **Crop Science**, v.47, p.72-87, 2007.

FEHR, W.R.; HAMMOND, E.G. A16 soybeans having low linolenic acid and descendants. U.S. **Patent Number**, v.5, p.710-369, 1998.

FEHR, W.R.; HAMMOND, E.G. Reduced linolenic acid production in soybeans. U.S. **Patent Number**, v.6, p.133-509, 2000.

- FEHR, W.R.; WELKE, G.A.; HAMMOND, E.G.; DUVICK, D.N.; CIANZIO S.R. Inheritance of reduced linolenic acid content in soybean genotypes A16 and A17. **Crop Science**, v.32, p.903–906, 1992.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª edição, Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- FREY, K.J., AND T. HORNER. Heritability in standard units. **American Society of Agronomy**, v.49, p.59–62, 1957.
- GESTEIRA, A. S. **Estudo de herança e de marcadores moleculares para teor de ácido linolênico em soja**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 50p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- GESTEIRA, A. S.; SCHUSTER, I.; JOSÉ, I. C.; PIOVESAN, N. D.; VIANA, SORIANO, J. M.; BARROS, E. G. de; MOREIRA, M. A. Biometrical analyses of linolenic acid content of soybean seeds. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.1, p.1415-4757, 2003.
- GRAEF, G.L.; FEHR, W.R.; MILLER, L.A.; HAMMOND, E.G.; CIANZIO, S.R. Inheritance of fatty acid composition in a soybean mutant with low linolenic acid. **Crop Science**, v.28, p.55–58, 1988.
- HAMMOND, E. G.; FEHR, W. R. Oil quality improvement in soybean, (*Glycine max* (L.) Merr.). **Fette Seifen Anstrichm**, v.77, p.97-101, 1975.
- HAMMOND, E.G.; FEHR, W.R. Registration of A5 germplasm line of soybean (Reg. No. GP44). **Crop Science**, v.23, p.192-193, 1983.
- HANSON, W.D. Heritability. In: SYMPOSIUM ON STATISTICAL GENETICS AND PLANT BREEDING, 1961, Raleigh. **Proceedings...** Washington: NAS/NRC, 1963. p.125-140.
- HAWKINS, S.E.; FEHR, W.R.; HAMMOND, E.G., CIANZIO, S.R. Use of tropical environments in breeding for oil composition of soybean genotypes adapted to temperate climates. **Crop Science**, v.23, p.897-899, 1983.
- HILDEBRAND, D.F.; HAMILTON-KEMP, T.R.; LEGG, C.S.; BOOKJANS, G. Plant lipoxygenases: occurrence, properties and possible functions. **Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology**, Columbia, v.7, p.201-219, 1988.
- HILLEL, J., T. SCHAAP, A. HABERFELD, A. J. JEFFREYS, Y. PLOTZKY *et al.*, DNA fingerprints applied to gene introgression in breeding programs. **Genetics**, v.124, p.783–789, 1990.
- HOSPITAL, F., C. CHEVALET and P. MULSANT, Using markers in gene introgression breeding programs. **Genetics**, v.132, p.1199–1210, 1992.

JACQUARD, A. Heritability: one word, three concepts. **Biometrics**, v.39, n.2, p.465-77, 1983.

KINNEY, A.J. Development of genetically engineered soybean oils for food applications. **Journal of Food Lipids**. v.3, p.273-276, 1996.

KITAMURA, K., DAVIES, C.S., NIELSEN, N.C. Inheritance of alleles for *Ggy1* and *Gy4* storage protein genes in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.68, n.3, p.253-254, 1984.

KLEIMAN, R.; CAVINS, J.F. Soybean germplasm evaluation search for low-linolenic lines. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.59, p.305, 1982.

LANNA, A. C. **Efeito da temperatura sobre a regulação da síntese de ácidos graxos polinsaturados em soja**. Viçosa, MG: UFV, 2002. (Doutorado em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa – MG).

LANNA, A. C.; JOSE, I. C.; OLIVEIRA, M. G. A. *et al.* Efeito do acúmulo de ácidos graxos poliinsaturados em sementes de soja. **Braz. J. Plant Physiol.**, v.17, n.2, p.213-222, 2005.

LANZA, M.A., GUIMARÃES, C.T., SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v.21, p.97-108, 2000.

LIU, H., WHITE, P.J. Oxidative stability of soybean oils with altered fatty acid composition. **JAOCs**, v.69, n.6, p.528-532, 1992.

LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology, and utilization**. 1ª Ed. Chapman & Hall, New York, 1997. 532p.

MALLMANN, I. L.; BARBOSA NETO, J, F.; CARVALHO, F. I. F.; FEDERIZZI, L. C. Mecanismos de seleção aplicadas sobre o caráter tamanho de grãos em populações segregantes de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira Brasília**, v.29, n.3, p.427-437, 1994.

MEKHEDOV, S.; ILÁRDUYA, M.; OHLROGGE, J. Toward a functional catalog of the plant genome. A survey of genes for lipid biosynthesis. **Plant Physiology**, v.122, p.389-402, 2000.

MORAES, R. M. A. **Eficiência de seleção para teores dos ácidos oléico e linolênico em soja cultivada em duas temperaturas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa. 1999.

NARVEL, J.M.; CHU, W.C.; FEHR, W.R.; CREGAN, P.B.; SHOEMAKER, R.C.; Development of multiplex sets of SSR markers covering the soybean genome. **J Mol Breed**, v.6, p.175–183, 2000.

NEFF, W. E.; LIST, G. R. Oxidative stability of natural and randomized high-palmitic and high-stearic acid oils from genetically modified soybean varieties. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.76, p.825-831, 1999.

- NEFF, W. E.; SELKE, E.; MOUNTS, T. L.; RINSCH; FRANKEL, E. N.; ZEITOUN, M. A. M. Effect on triacylglycerol composition and structures on oxidative stability of oils from selected soybean germplasm. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.69, p.111-118, 1992.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1009p.
- NYQUIST, W.E. Estimation of heritability and prediction of selection response in plant populations. **Critical Reviews in Plant Science**, v.10, p.235-322, 1991.
- OHLROGGE, J.; BROWSE, J. Lipid biosynthesis. **Plant Cell**, v.7, p.957-970, 1995.
- OHLROGGE, J.; JAWORSKI, J. G. Regulation of fatty acid synthesis. **Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.48, p.109-136, 1997.
- OPENSHAW, S. J., S. G. JARBOE, AND W. D. BEAVIS. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: Proceedings of the Symposium Analysis of Molecular Marker, Corvallis, Oregon. **Am. Soc. Hortic. Sci. and Crop Sci. Soc. Am**, 1994.
- PANTHEE, D. R.; PANTALONE, V. R.; SAXTON, A. M. Modifier QTL for fatty acid composition in soybean oil. **Euphytica**, v.152, p.67-73, 2006.
- PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa. Editora UFV, p.429-485. 1999.
- PRIMOMO, V. S.; FALK, D. E.; ABLETT, G. R.; TANNER, J. W.; RAJCAN, I. Inheritance and Interaction of Low Palmitic and Low Linolenic Soybean. **Crop Science**, v.42, p.31-36, 2002.
- RAHMAN, S.M.; TAKAGI, Y. Inheritance of reduced linolenic acid content in soybean seed oil. **Theor. And Appl. Gene.**, v.94, p.229-302, 1997.
- RAHMAN, S.M.; TAKAGI, Y., KINOSHITA, T. Genetic control of high oleic acid content in the seed oil of two soybean mutants. **Crop Science**, v.36, p.1125-1128, 1996.
- RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; ZIMMERMANN M. J. O. **Genética quantitativa em plantas autógamas; aplicações ao melhoramento do feijoeiro**. Goiânia: Editora da UFG, 1993. 271 p.
- RAO, R.C. **Advanced statistical methods in biometric research**. New York: John Wiley, 1952. 390 p.
- REBETZKE, G.J.; PANTALONE, V.R.; BURTON, J.W.; CARTER JR, T.E.; WILSON, R.F. Genotypic variation for fatty acid content in selected *Glycine max* x *Glycine soja* populations. **Crop Science**, v.37, p.1636-1640, 1997.
- RENNIE, B. D.; TANNER, J. W. New allele at the *Fan* locus in the soybean line A5. **Crop Science**, v.31, p.297-301, 1991.

- RIBAUT JM AND HOISINGTON D Simulation experiments on efficiencies of gene introgression by backcrossing. **Crop Science**, v.42, p.557-565, 2002.
- ROSS, A.J.; FEHR, W.R.; WELKE, G.A.; HAMMOND, E.G.; CIANZIO, S.R.. Agronomic and seed traits of 1%-linolenate soybean genotypes. **Crop Science**, v.40, p.383–386, 2000.
- SASAKI, Y.; KONISHI, T.; NAGANO, Y. The compartmentment of acetyl-coenzyme A carboxylase in plants. **Plant Physiol**, v.108, p.445-449, 1995.
- SCHNEBLY, S. R., FEHR, W. R. Effect of years and planting dates on fatty acid composition of soybean genotypes. **Crop Science**, v.33, p.716-719, 1993.
- SEDIYAMA , T., TEIXEIRA, R.C., REIS, M. S. Melhoramento de soja. *In*: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa – MG, p.487-534, 1999.
- SENIOR, M. L.; MURPHY, J. P.; GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. **Crop Science**, v.38, p.1088-1098, 1998.
- SMITH, C.; MEUWISSEN T. H .E.; GIBSON J. P.; On the use of transgenes in livestock improvement. **Anim. Breed**, v.55, p.1-10, 1987.
- SMITH, H. C.; KINMAN, M. L. The use of parent-offspring regression as estimator of heritability. **Crop Science**, v.5, p.595-596, 1965.
- SMITH, J. S. C.; CHIN, E. C. L; SHU, H.; SMITH, O. S.; WALL, S. J.; SENIOR, M. L.; MITCHEL, S. E.; KRESOVICH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.95, p.163-177, 1997.
- SMITH, K. J. Improving the quality of the soybean. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.58, n.2, p.135-139, 1981.
- SOMERVILLE, C.; BROWSE, J., Plant Lipids: metabolism, mutants, and membranes. **Science**, v.252, p.80-87, 1991.
- SONG, Q. J.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; CONCIBIDO, V. C. *et al.* A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theor. Appl. Genet**, v.109, p.122–128, 2004.
- SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. *In*: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento –plantas**. Rondonópolis: Fundação MT,. Cap. 29, p. 939-966, 2001.
- STOJSIN, D.; LUZZI, B.M., ABLETT, G.R.; TANNER, J.W.. Inheritance of low linolenic acid level in the soybean line RG10. **Crop Science**, v.38, p.1441–1444, 1998.

STREIT, L. G.; FEHR, W. R.; WELKE, G. A.; HAMMOND, E. G.; CIANZIO, S. R.. Family and Line Selection for Reduced Palmitate, Saturates, and Linolenate of Soybean. Published in **Crop Science**, v. 41, p.63–67, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p.274-276, 2004.

TANYA, P.; SRINIVES, P.; TOOJINDA, T.; VANAVICHIT, A.; HA, B. K; BAE, J. S.; MOON, J. K.; LEE, S. H. Evaluantion of genetic diversity among soybean genotypes using SSR and SNP. **Korean J. Crop Science**, v.46, n.4, p.334-340, 2001.

TÖPFER, R.; MARTINI, N., SCHELL, J., Modification of plant lipid synthesis. **Science**, v.268, p.681-685, 1995.

VENCOVSKY, R. Herança quantitativa. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G.P. **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. 2.ed. Campinas : Fundação Cargill, p.137-214,1987.

VERNETTI, F.J. Origem da espécie, introdução e disseminação no Brasil. In: VERNETTI, F.J. (Ed.) **Soja: genética e melhoramento**. Campinas: Fundação Cargill, p. 3-17,1983.

WHITE, H. B.; QUAKENBUSH, F. W.; PROBST, A. H. Ocurrence and inheritance of linolenic and linoleic acids in soybean seeds. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.38, p.113-117, 1961.

WILCOX, J. R.; CALVINS, J. F. Gene symbol assigned for linolenic acid mutant in the soybean. **J. Hered.**, v.78, p.410, 1987.

WILCOX, J. R.; CAVINS, J. F.; NIELSEN, N. C. Genetic alteration of soybean oil compositon by a chemical mutagen. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.61, p.97-100, 1984.

WILCOX, J.R.; GUODONG, Z. Relationship between seed yield and protein in determinate and indeterminate soybean population. **Crop Science**, v.37, p.361-364, 1997.

WILSON, R. F.; BURTON, J. W.; BRIM, C. A. Progress in the selection for altered fatty acid composition in soybeans. **Crop Science**, v.21, p.788-791, 1981.

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. 1996.