

FRANCIELE BARROS DE SOUZA

SELEÇÃO DE GENES CANDIDATOS, IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE  
MARCADORES SNPs PARA CONTEÚDO DE ÓLEO EM SOJA

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2013

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

T

S729s  
2013

Souza, Franciele Barros de, 1987-

Seleção de genes candidatos, identificação e validação de marcadores SNPs para conteúdo de óleo em soja / Franciele Barros de Souza. – Viçosa, MG, 2013.  
vii, 45f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Maurilio Alves Moreira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 33-40

1. Marcadores genéticos. 2. Locos de caracteres quantitativos. 3. Soja - Teor de proteína. 4. Soja - Teor de óleo. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

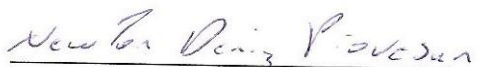
CDD 22. ed. 576.54

FRANCIELE BARROS DE SOUZA

SELEÇÃO DE GENES CANDIDATOS, IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE  
MARCADORES SNPs PARA CONTEÚDO DE ÓLEO EM SOJA

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

APROVADA: 21 de fevereiro de 2013.



Newton Deniz Piovesan  
(Coorientador)



Taís Cristina Bastos Soares



Maurílio Alves Moreira  
(Orientador)

A Deus,  
Aos meus pais Geraldo Germano de Souza e Áurea Lúcia de Barros Souza,  
Ao meu namorado Rodrigo Gonçalves Sobreira.

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde, força, coragem para prosseguir diante às dificuldades e ter me proporcionado vencer mais esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Áurea e Geraldo, pelo apoio, incentivo e ajuda em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Fabiana, Fabíola e Fábio, e todos os meus familiares, pela torcida e motivação.

Ao meu namorado Rodrigo pelo amor, paciência e dedicação em todos os momentos, por compreender minhas ausências e sempre fazer tudo para me deixar feliz.

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de pós-graduação em Bioquímica Agrícola pela oportunidade de realizar o mestrado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão da bolsa de pesquisa.

Ao Secretário da pós-graduação Eduardo, por todos os esclarecimentos com excelência em atendimento.

Ao Prof. Dr. Eduardo Mizubuti por ter permitido o uso do PCR em tempo real e ao pós-doutorando Bráz por ter me auxiliado no uso do aparelho no laboratório.

Ao Prof. Dr. Cosme e ao pós-doutorando Rafael pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Professor Maurilio Alves Moreira, pela oportunidade, orientação e confiança.

Ao Professor Everaldo e ao Newton pela co-orientação, pelos ensinamentos e auxílio na execução dos experimentos.

À Professora Taís, pela presença na banca de defesa da dissertação, pelos conselhos, confiança e amizade.

Aos companheiros do laboratório de Genética Molecular de Plantas, Rafael, Luiz Cláudio, Maria Fernanda, Flávio, Carla, Bruno, Isadora e Pedro, pela boa convivência. Em especial ao Rafael pela colaboração na condução desta pesquisa e ao Luiz Cláudio pelo auxílio no entendimento da estatística.

As amigas de República, Érica (keke) e Thaís (Thatha) pela amizade, conselhos, companheirismo e por tornarem a vida em Viçosa mais feliz e agradável.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a condução deste trabalho e também àqueles que estiveram presente durante a realização do mestrado.

## **BIOGRAFIA**

Franciele Barros de Souza, filha de Geraldo Germano de Souza e Áurea Lúcia de Barros Souza, nasceu em 05 de junho de 1987, em Manhuaçu - MG.

Estudou o ensino médio no Colégio Anglo de Viçosa, concluindo em dezembro de 2004.

Em 2006 iniciou o curso de Bacharel em Ciências Biológicas pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, graduando-se em dezembro de 2010. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica de 2007 a 2009 na área de Biologia Molecular, em 2007 foi monitora de química básica, em 2009 foi monitora do programa de bolsas de iniciação científica júnior e de 2009 a 2010 foi bolsista no projeto de extensão de tutoria em Biologia.

Em Março de 2011, foi admitida no Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado, submetendo-se a defesa em Fevereiro de 2013.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1. <i>Importância Socioeconômica da Soja.....</i>	3
2.2. <i>Cenário Mundial e Importância do Óleo de Soja.....</i>	4
2.3. <i>Caracterização Química dos Óleos Vegetais.....</i>	4
2.4. <i>Biossíntese de Ácidos Graxos.....</i>	5
2.5. <i>Marcadores Moleculares e Locus com Características Quantitativas.....</i>	7
2.5.1. Polimorfismos de Base Única (SNPs).....	8
2.5.2. Identificação de SNPs e Técnicas de Genotipagem.....	9
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>13</b>
3.1. <i>Objetivo Geral.....</i>	13
3.2. <i>Etapas.....</i>	13
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
4.1. <i>Seleção de Genes Candidatos e Identificação de Polimorfismos.....</i>	14
4.1.1. Pesquisa no banco de dados da soja (soybase).....	14
4.1.2. Análise no Phytozome.....	14
4.1.3. Alinhamento no ClustalW.....	14
4.1.4. Análise <i>in silico</i> .....	15
4.1.5. Desenho dos <i>Primers</i> .....	15
4.1.6. Material Genético.....	15
4.1.7. Extração de DNA.....	16
4.1.8. Reação de PCR.....	16
4.1.9. Purificação da reação de PCR e Sequenciamento de DNA.....	17
4.2. <i>Processo de Validação dos SNPs.....</i>	17
4.2.1. Processo de Genotipagem.....	17
4.2.2. Processo de Fenotipagem.....	18
4.2.3. Análises estatísticas.....	18
4.3. <i>Seleção de Genes Candidatos e Identificação de Polimorfismos.....</i>	19
4.4. <i>Genotipagem, Fenotipagem e Validação dos genes polimórficos.....</i>	24
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>32</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>33</b>

## RESUMO

SOUZA, Franciele Barros de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2013. **Seleção de genes candidatos, identificação e validação de marcadores SNPs para conteúdo de óleo em soja.** Orientador: Maurilio Alves Moreira. Coorientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Newton Deniz Piovesan.

A soja é uma cultura agrícola amplamente distribuída por quase todas as regiões do mundo. É uma das principais oleaginosas produzidas e tornou-se uma espécie de grande interesse, devido aos teores elevados de proteína e óleo, à produtividade dos grãos e à possibilidade de sua adaptação a ambientes diversos. Tem sido muito visada como matéria prima renovável, principalmente na produção de biodiesel, sendo uma alternativa para diminuição da dependência dos derivados de petróleo. Diferentes marcadores moleculares são utilizados como ferramentas para a compreensão de herança, relações entre indivíduos e populações e para auxiliar no processo de seleção de caracteres quantitativos. Os marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) têm sido usados em estudos de associação baseados em genes candidatos. Para isto, tecnologias de genotipagem para identificação de SNPs, têm apresentado grandes avanços, como a análise de dissociação em alta resolução (*High Resolution Melting analysis Analysis - HRMA*), que é um método pós-PCR, para identificar alterações no DNA através da observação da distorção que ocorre na curva de dissociação das amostras. Baseado nestas descrições objetivou-se neste trabalho, selecionar genes candidatos para conteúdo de óleo em soja, identificar SNPs e validá-los em uma população de RILs (linhagens recombinantes endogâmicas), oriundas do cruzamento entre genótipos parentais Suprema e CD01RR8384. Foi possível selecionar 25 genes relacionados à biossíntese de lipídeos no soybase e, através do Northern eletrônico, pode-se observar que 14 destes genes foram expressos. Na análise de polimorfismos dos 14 genes, foram encontrados 52 SNPs, e com a genotipagem HRM na população de RILs, verificou-se o perfil de homozigose e heterozigose, havendo eficiência na identificação dos SNPs. Realizando-se a validação dos SNPs na população, observou-se que não foi possível associar os polimorfismos com as variações fenotípicas. Os SNPs distribuíram-se aleatoriamente, independente do conteúdo de óleo. Esta não correlação pode ser devido ao uso de uma população de RILs cultivada em um único ambiente e a possibilidade de ter sido selecionado QTLs de pequeno efeito.

## ABSTRACT

SOUZA, Franciele Barros de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Candidate genes selection, identification and validation of SNPs markers for oil content in soybean.** Adviser: Maurilio Alves Moreira. Co-advisers: Everaldo Gonçalves de Barros and Newton Deniz Piovesan.

Soybean is a crop widely distributed in almost all regions of the world. It is a major oilseed produced and become a species of great interest, due to the high content of protein and oil, productivity and the possibility of adaptation to different environments. It has been widely targeted as a renewable raw material, mainly for the production of biodiesel. Different molecular markers are used as tools for understanding the inheritance of quantitative traits and to assist in the selection process. SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) markers have been used in association studies based on candidate genes. For that, genotyping technologies for SNP identifying, have shown great advances, as the HRMA (*High Resolution Melting analysis*), which is a post-PCR method, to identify changes in DNA by observing the distortion that occurs in the samples melting curves. Based on these descriptions the aim of this study was to select candidate genes for soybean oil content, identify SNPs and validate them in one population of RILs (Recombinant Inbred Lines), originated from crosses between parental genotypes Supreme and CD01RR8384. It was selected 25 genes related to lipid biosynthesis in the soybase and, through electronic Northern, it can be seen that these, 14 genes were expressed. In the polymorphisms analysis of the 14 genes, 52 SNPs were found, and with HRMA genotyping on the RIL population, it was observed the homozygous and heterozygous profile, with efficient SNPs identification. Performing the validation of SNPs in the population, we observed that it was not possible to associate them with phenotypic variation. SNPs were distributed randomly, independent of oil content. This lack of correlation may be due to the use of RIL population cultivated in a single environment and the possibility of being selected QTLs small effect.

## 1. INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.)Merrill], é uma das principais culturas agrícolas cultivadas praticamente em todo território mundial e possui destaque no cenário mercadológico de exportação nacional (PAIVA et al., 2006, EMBRAPA, 2004).

O grande interesse no seu cultivo deve-se à composição típica do grão, que apresenta em média de 40% de proteína e 20% de óleo, além da alta produtividade de seus cultivares.

Além disso, dentre as diferentes fontes de biomassa, o óleo de soja constitui uma potencial fonte de recurso renovável para a produção de combustíveis, transformando-se em uma alternativa viável comparada ao diesel (CAVALCANTE et al., 2011).

O óleo de soja é composto por triacilgliceróis (TAGs), tendo como precursores os ácidos graxos e glicerol 3-fosfato. Dos ácidos graxos são constituídos por 12% de ácido palmítico (16:0), 4% de ácido esteárico (18:0), 23% de ácido oléico (18:1)<sup>Δ<sup>9</sup></sup>, 53% de ácido linoléico (18:2)<sup>Δ<sup>6,9</sup></sup>, e 8% de ácido linolênico (18:3)<sup>Δ<sup>3,6,9</sup></sup> (BAUD et al., 2010). A biossíntese destes ácidos graxos é catalisada por conjuntos diferentes de enzimas, sendo que a enzima acetil-CoA carboxilase converte acetil-CoA e CO<sub>2</sub> a malonil-CoA, em uma reação dependente de ATP. O malonil-CoA produzido pela ação da acetil-CoA carboxilase é transferido para a proteína carreadora de grupos acil (ACP) e são alongados com adição sequencial de outras unidades de C<sub>2</sub> para formação de ácido graxo comum com 16 ou 18 carbonos (DURRET et al., 2008; ANTHONY et al., 2000).

O controle genético das características de interesse em soja envolve geralmente vários genes e tem interação significativa com o ambiente. A utilização de marcadores moleculares tem levado a identificação de inúmeros locos para tais características. Neste sentido, os marcadores moleculares apresentam-se como uma poderosa ferramenta para o melhoramento de plantas, aumentando potencialmente sua eficiência por meio de estratégias de seleção assistida por marcadores (SAM) (HALLAUER e MIRANDA, 1988).

Existem vários tipos de marcadores moleculares que foram sendo desenvolvidos ao longo dos anos. Os SNPs são baseados em variações de nucleotídeos ou pequenas inserções/deleções nas sequências de bases em fragmentos

homólogos de DNA, ocorrendo com grande frequência em todos os genomas (COLLINS, 1998; BOTSTEIN e RISCH, 2003), e por isso tem sido foco de pesquisa de diversos grupos, para o desenvolvimento de marcadores polimórficos e estudos de associação baseados em genes candidatos (RAFALKI, 2002).

O conhecimento das funções dos genes envolvidos diretamente na biossíntese de lipídios e a identificação de SNPs nestas regiões genômicas, podem possibilitar a identificação de genes candidatos e o desenvolvimento de marcadores alelo específicos relacionados à expressão da característica conteúdo do óleo em grãos de soja (MEHRZAD et al., 2013).

Plataformas de sequenciamento e ferramentas de bioinformática, têm permitido a descoberta mais rápida de polimorfismos, levando para uma visão muito mais abrangente do genoma ou transcriptoma, possibilitado o desenvolvimento de marcadores baseados em um único par de bases (SNP) (DESCHAMP e CAMPBELL, 2009).

Ao longo dos últimos anos um grande esforço tem sido dedicado ao desenvolvimento de tecnologias de genotipagem mais precisas, rápidas, e de baixo custo para identificação de SNPs (SOBIN, K. & ASHISH M., 2007). A análise de dissociação em alta resolução (*High Resolution Melting analysis - HRMA*) é um método pós-PCR, realizado no aparelho PCR em tempo real, que identifica alterações no DNA através da observação da distorção que ocorre na curva de dissociação das amostras (WITTEWER et al.; 2003; GRAHAM et al., 2005). Para isto um fluoróforo capaz de se intercalar ao DNA de dupla fita é adicionado na reação de amplificação e a amostra é aquecida ao longo de um gradiente de temperatura, enquanto a fluorescência é continuamente coletada para gerar a curva de dissociação (VANDERSTEEN et al., 2007; ERALI, et al.; 2008).

Objetivou-se neste trabalho selecionar genes candidatos no banco de dados da soja (soybase) relacionados ao conteúdo de óleo a partir de informações dos QTLs para teor de óleo. A seguir, identificar SNPs nos genes selecionados e validá-los, utilizando a metodologia de HRM, em uma população de RILs do programa de melhoramento da qualidade da soja em desenvolvimento no BIOAGRO/UFV.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Importância Socioeconômica da Soja**

A soja é uma cultura agrícola amplamente distribuída por quase todas as regiões do mundo, devido à facilidade do seu cultivo, da aplicabilidade de seus produtos e derivados, e por apresentar grande importância socioeconômica (PAIVA et al. 2006; EMBRAPA, 2004). Possui grande destaque no mercado internacional, por fornecer matéria-prima para a indústria de óleos vegetais, proteína e farelo (consumo animal). É uma das principais oleaginosas produzidas e consumidas mundialmente e tornou-se uma espécie de grande interesse, devido aos teores elevados de proteína e óleo, à produtividade dos grãos e à possibilidade de sua adaptação a ambientes diversos (SILVA et al., 2010; DYER et al., 2008).

A soja é constituída, em média, por 40% de proteína, 20% de óleo, 35% de carboidratos e 5% de cinzas com base no peso seco da semente. Cada componente é afetado pelas condições ambientais na fase de enchimento dos grãos e varia de acordo com os diferentes genótipos (LEE et al., 2007).

O cultivo e produção da soja vêm aumentando a cada ano, sendo que na safra 2011/2012, a área mundial cultivada foi de aproximadamente 100 milhões de hectares e a produção superior a 250 milhões de toneladas. No Brasil, a área semeada nesta mesma safra foi superior a 25 milhões de hectares, com produção de 66.383 milhões de toneladas (USDA, 2011; CONAB, 2011).

Segundo a Conab a previsão da área a ser cultivada para o ano de 2012/2013 está entre 26,43 e 27,38 milhões de hectares correspondendo a um crescimento entre 5,5 e 9,3% com uma produção aproximada de 82 milhões de toneladas, representando um acréscimo de, aproximadamente, 23 milhões de toneladas (CONAB, 2012).

Neste cenário, o Brasil é o segundo maior produtor, processador e exportador mundial de soja, farelo e óleo (SOYSTAT, 2012), com áreas disponíveis, condições climáticas e tecnologias para ser, em curto prazo, o maior produtor mundial, para atender a crescente demanda, principalmente da comunidade Européia e Ásia (EMBRAPA, 2011).

## 2.2. Cenário Mundial e Importância do Óleo de Soja

O óleo de soja é o segundo óleo vegetal mais consumido do mundo, correspondendo a 28% do total, representando 56% da produção de oleaginosas (SOYSTATS, 2012). Os principais países produtores são Estados Unidos, China, Argentina e Brasil, representando respectivamente cerca de 25%, 19%, 18% e 16% da produção mundial (ICEX, 2011).

Além disso, é muito versátil quanto ao seu processamento e sua formulação, refina a baixo custo, possui pigmentos sensíveis ao calor que são removidos por desodorização, contém elevado teor de iodo, elevado teor de tocoferóis e de ácidos graxos essenciais (ERICKSON, 2001).

Também tem sido muito visado como matéria prima renovável para uma grande variedade de produtos industriais, incluindo biodiesel, sendo uma alternativa para diminuição da dependência dos derivados de petróleo, abrindo um novo mercado para essa oleaginosa, com excelentes perspectivas econômicas e amplos benefícios ambientais (LEE et al., 2007; CLEMENTE e CAHOON, 2009).

Atualmente, a produção de biodiesel vem crescendo no mundo todo, com destaque para a União Européia, que lidera a produção mundial, seguida pelos Estados Unidos e pelo Brasil. Estima-se que a soja seja responsável por 70% a 80% do biodiesel produzido no país e para atender à demanda cada vez mais crescente de biodiesel pode-se aumentar a área cultivada (ainda disponível no Brasil) e, também, aumentar a produtividade de óleo via melhoramento genético (ARAÚJO, 2006).

A substituição de óleo diesel importado e a necessidade de se utilizar fontes renováveis e sustentáveis tornam-se premente a necessidade de se desenvolver novas cultivares produtivas de soja com teores elevados de óleo nos grãos (CAVALCANTE et al., 2011).

## 2.3. Caracterização Química dos Óleos Vegetais

As propriedades físicas e químicas dos óleos vegetais são determinadas pelo seu conteúdo em ácidos graxos e das suas posições dentro da molécula de triacilglicerol. Quimicamente, todos os óleos são compostos por ésteres de glicerol e por ácidos graxos, no entanto, as suas propriedades físicas são muito diferentes,

devido às diferentes proporções dos ácidos graxos e às diversas estruturas de triacilgliceróis existentes em cada óleo (DURRETT et al., 2008).

As cadeias dos ácidos graxos variam entre 4 e 24 átomos de carbonos, podendo ter até 3 ligações duplas. Dado ao elevado conjunto de possibilidades no que se refere ao número total de átomos de carbono, grau de insaturação, geometria e posição das ligações duplas, ocorrência de grupos substituintes e as suas respectivas posições na cadeia carbonada, existe uma grande diversidade de ácidos graxos na natureza. No entanto, os mais abundantes são os de cadeia linear e com número par na sua cadeia carbonada. Assim, os ácidos graxos podem ser classificados como saturados, monoinsaturados e polinsaturados (LEE et al., 2007).

Óleo da semente da soja é composto por 12% de ácido palmítico (16:0), 4% de ácido esteárico (18:0), 23% de ácido oléico (18:1)<sup>Δ<sup>9</sup></sup>, 53% de ácido linoléico (18:2)<sup>Δ<sup>6,9</sup></sup>, e 8% de ácido linolênico (18:3)<sup>Δ<sup>3,6,9</sup></sup>. As frações 16:0 e 18:0 são ácidos graxos saturados que constituem 15% do óleo de soja, os 85% restantes são compostos de ácidos graxos insaturados 18:1, 18:2 e 18:3 (BAUD e LEPINIEC, 2010).

Devido aos efeitos benéficos para a saúde, têm sido estimulado o desenvolvimento de variedades de soja com menor teor de gorduras saturadas, diminuindo o teor dos ácidos graxos 16:0 e 18:0 de 15% para 7%, com maior teor de ácido oléico (18:1) para aumentar a estabilidade oxidativa e extensão da utilidade de óleo de soja, a temperaturas de cozimento elevadas. Uma dieta em que o consumo de óleo é elevado em 18:1 está associada com redução de colesterol, arteriosclerose e doenças do coração (GRUNDY, 1986; WARDLAW e SNOOK 1990; CHANG e HUANG, 1998). Além disso, pesquisas também têm focado na redução dos ácidos graxos poliinsaturados linoléico (18:2) e linolênico (18:3), devido a susceptibilidade de oxidação, resultando em redução da vida de prateleira, baixa estabilidade a elevadas temperaturas de cozimento e sabores desagradáveis (LEE et al., 2007).

#### 2.4. Biossíntese de Ácidos Graxos

A biossíntese de ácidos graxos é catalisada por conjuntos diferentes de enzimas e ocorre em compartimentos distintos da célula. A etapa inicial ocorre no cloroplasto, em que a enzima acetil-CoA carboxilase converte acetil-CoA e CO<sub>2</sub> a malonil-CoA, em uma reação dependente de ATP. O malonil-CoA produzido pela

ação da acetil-CoA carboxilase é transferido para a proteína carreadora de grupos acil (ACP) e são alongados com adição sequencial de outras unidades de C<sub>2</sub> para formação de ácido graxo comum com 16 ou 18 carbonos que serão transportados para o citoplasma ou seguirão a via plastidial do glicerol-3-fosfato (DURRET et al., 2008; ANTHONY et al., 2000).

Após a transferência do malonil-CoA ao ACP, inicia-se uma etapa de condensação dos grupos acetil e malonil, catalisada pela enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase, para formar acetoacetil-ACP. Posteriormente ocorre uma etapa de redução do grupo carbonila, produzindo hidroxibutiril-ACP, catalisada pela cetoacil-ACP redutase e tendo o NADPH como doador de elétrons. A reação seguinte é a desidratação pela hidroxibutiril-ACP desidratase para formar duplas ligações no produto, trans-butenoil-ACP. Finalmente ocorre a redução da dupla ligação pela ação da enoil-ACP redutase para produzir butiril-ACP. A ação combinada destas reações promove o alongamento do precursor de ácido graxo em dois carbonos por ciclo (BAUD et al., 2008; KINNEY, 1994).

Sete ciclos de condensação e redução produzem o grupo palmitoil saturado com 16 carbonos, neste ponto o alongamento da cadeia geralmente cessa e o palmitato livre é separado da molécula de ACP pela ação de uma atividade hidrolítica existente no complexo sintase. O palmitato é o precursor do estearato (18:0), dos ácidos graxos saturados com cadeia ainda mais longa e, também dos ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados (DAVID e MICHAEL, 2010).

No retículo endoplasmático ocorre a formação de triacilgliceróis (TAGs), tendo como precursores os ácidos graxos e glicerol 3-fosfato. O primeiro estágio na biossíntese dos TAGs, a glicerol-3-fosfato aciltransferase transfere o grupo acetil do acetil-Coa para a posição sn-1 do glicerol-3-fosfato produzindo ácido lisofosfatídico, em seguida, a 1-aciltransferase acil-glicerol-3-fosfato transfere outro grupo acil do acil-Coa para a posição Sn-2 do ácido lisofosfatídico, formando o ácido fosfatídico. A defosforilação do ácido fosfatídico por fosfatases de ácido fosfatídico leva a formação do diacilglicerol (DAG) que pode ser acetilado pela diacilglicerol aciltransferase na posição Sn-3 para a produção dos triacilgliceróis. Alternativamente, o ácido fosfatídico e o diacilgliceróis podem ser utilizados como precursores dos principais glicerolípídeos de membranas (ANTHONY et al., 2000, DYER et al., 2008).

Dado o valor elevado e demanda global de óleos, há um interesse considerável no aumento da produção de óleo por engenharia genética. Para isto, é muito importante uma melhor compreensão da biossíntese de ácido graxo e da sua regulação (BAUD et al., 2008; DURRETT et al., 2008; DYER et al., 2008).

## 2.5. Marcadores Moleculares e Locos com Características Quantitativas

Diferentes marcadores têm sido utilizados como ferramentas para a compreensão de herança e relações entre indivíduos e populações. Durante as últimas três décadas de desenvolvimento nas áreas de bioquímica e biologia molecular, muitos sistemas de manipulação do DNA foram surgindo, contribuindo para um melhor entendimento das relações de diferentes espécies (BENGTSSON, 2009).

O desenvolvimento de técnicas passaram a fornecer um número ilimitado de marcadores altamente polimórfico para qualquer organismo vivo, possibilitando a amplificação de fragmentos de DNA *in vitro*, através de PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando oligonucleotídeo iniciadores ou *primers* de sequências conhecidas e complementares às extremidades dos segmentos a serem amplificados, direcionando a síntese de DNA alvo em ciclos repetidos (MULLIS et al., 1986).

A caracterização de genótipos por meio de marcadores moleculares tem-se tornado cada vez maior e têm auxiliado no mapeamento genético, separação entre espécies de plantas, no estudo da quantidade de variação no germoplasma de plantas, comparações entre diferentes acessos e seleção de indivíduos no melhoramento genético (FORT-LLOYD et al., 1994).

A natureza poligênica dos caracteres de importância agrônômica e a interação genótipo-ambiente constituem um dos maiores desafios para o processo de seleção de plantas em programas de melhoramento (BORÉM e CAIXETA, 2006). Sendo assim, a utilização de marcadores moleculares permite a identificação e seleção de indivíduos baseada diretamente no genótipo, o que resulta em maior eficiência nos ganhos genéticos (LOPES, 2007).

As características de importância agrônômica geralmente são de herança quantitativa, e sua manipulação é complexa em relação às características de herança simples. O controle genético da variação quantitativa envolve geralmente muitos locos, de efeito e magnitude na maioria das vezes desconhecida. Estes locos, chamados de QTLs (*Quantitative Trait Loci*), tem sido muito estudados por

marcadores moleculares, levando a identificação das principais características de interesse (BOUCHEZ, et al., 2002), principalmente relacionados com a concentração de óleo em sementes na cultura da soja, o que pode facilitar no desenvolvimento de genótipos com alto teor de óleo (DIERS et al., 1992; LEE et al., 1996; CANAKCI e GERPEN, 2001; HYTEN et al., 2004; PANTHEE et al., 2005; QI et al., 2011).

No melhoramento, os marcadores moleculares podem ser empregados para auxiliar no processo de seleção de caracteres quantitativos. Fatores de qualidade do grão, como conteúdo de proteína e óleo, têm recebido grande atenção dos melhoristas nos últimos tempos (NICHOLS et al., 2006).

Existem muitos tipos de marcadores moleculares que foram sendo desenvolvidos ao longo de muitos anos, com intuito de aprimorar a identificação de diversas características. Os principais podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA via PCR. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (BOTSTEIN et al., 1980) e minissatélites ou locos VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) (JEFFREYS et al., 1985). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (WILLIAMS et al., 1990); SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) (PARAN e MICHELMORE, 1993); Microssatélite (LITT e LUTY, 1989); AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (ZABEAU, 1993); ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) (ZIETKIEWICZ et al., 1994) e SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) (KWOK, 1996).

### 2.5.1. Polimorfismos de Base Única (SNPs)

SNPs são variações de nucleotídeos ou pequenas inserções/deleções nas sequências de bases em fragmentos homólogos de DNA, sendo estes as mais frequentes formas de polimorfismo observado no genoma (COLLINS, 1998). Ocorrem com grande frequência em todos os genomas, e provavelmente são responsáveis pela maioria das contribuições em variações alélicas do genótipo, resultando na variação do fenotípica (BOTSTEIN e RISCH, 2003).

Estes polimorfismos ocorrem tanto em regiões codificadoras (éxons), não codificadoras (íntrons), regiões transcritas e não traduzidas quanto em regiões

promotoras dos genomas (RAFALSKI, 2002). Podem também afetar o splicing alternativo, quando se encontram nas junções íntron-éxon; gerar alterações no padrão de expressão de genes quando ocorrem em regiões promotoras; gerar ou suprimir códons de terminação ou poliadenilação na molécula de RNA mensageiro; e alterar códons de iniciação de tradução e, conseqüentemente afetar a quantidade de proteína produzida (KWOK e GU, 1999).

SNPs em regiões cis-regulatórias podem ter um impacto considerável em um fenótipo, uma vez que, podem alterar a afinidade de fatores de transcrição por estas regiões, alterando o nível de transcrição e, podendo levar a uma mudança na disponibilidade de uma determinada proteína. Acredita-se que tenham um papel importante na evolução das espécies por levarem a uma modulação leve de determinados traços fenotípicos (WRAY, 2007).

No genoma de soja, a frequência de ocorrência de SNPs tem sido o objetivo de estudo de diversos grupos de pesquisa, para o desenvolvimento de marcadores polimórficos para uso no mapeamento genético de alta resolução, assim como para estudos de associação baseados em genes candidatos (RAFALSKI, 2002).

O conhecimento das funções dos genes envolvidos diretamente na biossíntese de lipídios e a identificação de SNPs nestas regiões genômicas, podem possibilitar a identificação de genes candidatos e o desenvolvimento de marcadores alelo específicos relacionados à expressão da característica conteúdo do óleo em grãos de soja (MEHRZAD. et al; 2013).

### 2.5.2. Identificação de SNPs e Técnicas de Genotipagem

Detecção de variantes no genoma dentro de uma espécie é o primeiro passo para relacionar as variações genotípicas e fenotípicas. A conversão destas variantes genéticas em marcadores moleculares é muito importante em espécies de culturas agronômicas, pois permite uma efetiva estratégia de seleção assistida com marcadores, fingerprinting do genoma inteiro, estudos de associação, mapa de genes baseado em clonagem e análises de base populacional (ANSORGE, 2009).

Para esses objetivos, plataformas de sequenciamento de última geração têm permitido a descoberta de polimorfismos mais rápidos, levando para uma visão muito mais abrangente do genoma ou transcriptoma, possibilitando o

desenvolvimento de marcadores baseados em um único par de bases (SNP) (DESCHAMPS e CAMPBELL, 2009).

Com o uso de ferramentas de bioinformática, tem sido possível gerar e analisar um grande número de dados de sequências de DNA e dessa forma identificar SNPs (WANG et al., 1998). Além disso, também são úteis na construção e manutenção de bancos de dados que podem ser acessados pela internet e que atuam como sedes de referência para deposição de SNPs (GUIMARÃES e COSTA, 2002).

Ao longo dos últimos anos um grande esforço tem sido dedicado ao desenvolvimento de tecnologias de genotipagem mais precisas, rápidas, e de baixo custo para a análise de SNPs (SOBIN e ASHISH, 2007). O rápido progresso tecnológico faz com que seja difícil escolher métodos apropriados para uma determinada aplicação (CHEN e SULLIVAN, 2003).

A maioria dos métodos utilizados para genotipagem de SNPs se baseia na obtenção e na separação de produtos de PCR. Nesse processo geralmente ocorre a formação do produto alelo-específico para o SNP de interesse, por meio de reações bioquímicas e posteriormente ocorre a detecção do genótipo. Segundo Sobin e Ashish (2007), os métodos de extensão do *primer*, hibridização, ligação e clivagem enzimática são os mais utilizados para detecção alélica e os genótipos podem ser identificados com base em sua massa, fluorescência ou quimiluminescência.

O método básico de genotipagem é baseado na técnica de PCR-RFLP (VARSHNEY et al., 2007). O fragmento contendo o SNP de interesse é amplificado com iniciadores específicos, purificado e submetido a um tratamento com uma enzima de restrição que reconheça apenas um dos alelos. Posteriormente, os fragmentos são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose para diferenciação dos alelos por tamanho. Além de extremamente trabalhoso, para o emprego desse método, é necessário que haja uma enzima de restrição que diferencie os dois alelos, o que nem sempre é possível.

Um grande avanço na genotipagem de SNPs surge com metodologias que utilizam sequenciadores automáticos para a realização de uma eletroforese com produtos de PCR marcados com corantes fluorescentes (CAETANO, 2009).

Além disso, existe a metodologia de NUDGE (Nucleotide Depletion Genotyping), que utiliza espectrometria de massa (MALDI-TOF). Esta utiliza uma mistura de dideoxynucleotídeos faltando um dos nucleotídeos do sítio polimórfico para a reação. Durante a extensão dos *primers* a enzima DNA polimerase se dissocia

do molde de DNA na posição onde o nucleotídeo deletado for requerido, o que possibilita a determinação do polimorfismo, através da análise no espectrômetro MALDI-TOF, que detecta com exatidão os valores das massas nas reações (BLONDAL et al., 2003).

As metodologias de genotipagem utilizando equipamentos de PCR em Tempo Real (Real Time PCR), com a análise de dissociação em alta resolução (HRMA), também têm sido muito importantes (WITTEWER et al.; 2003).

#### 2.5.2.1. Análise de Dissociação em Alta Resolução (HRMA)

A análise de dissociação em alta resolução (*High Resolution Melting analysis* - HRMA) é um método pós-PCR bastante recente, homogêneo, rápido e simples. Foi introduzido em 2002 através da colaboração entre a academia (Universidade de Utah, UT, EUA) e a indústria (Idaho Technology, UT, EUA) para detecção de alterações na sequência do DNA (REED et al., 2007).

Esta técnica não necessita de processamento, adição de reagentes ou separação das amostras após a PCR, visto que um fluoróforo capaz de se intercalar ao DNA de dupla fita é adicionado na reação de amplificação gerando uma curva de dissociação. Para isso, a amostra é aquecida ao longo de um gradiente de temperatura, enquanto a fluorescência é continuamente coletada. Conforme a temperatura é elevada, a fluorescência decresce, refletindo a desnaturação do DNA em fita simples. A partir da curva de dissociação, a temperatura de dissociação ( $T_m$ ) da amostra pode ser obtida, a qual é definida como a temperatura em que 50% de cada molécula de DNA está desnaturada (VANDERSTEEN et al., 2007; ERALI et al., 2008).

A obtenção das curvas com alta resolução é possível devido à utilização de fluoróforos, que apresentam baixa toxicidade para a reação e não inibem a PCR mesmo presentes em altas concentrações. Isso significa que os sinais de fluorescência medidos têm maior fidelidade (sensibilidade e resolução), aparentemente devido à menor proporção de redistribuição de corante das regiões desnaturadas para aquelas ainda em dupla cadeia (REED et al., 2004; KRYPUY et al., 2006; HERRMANN et al., 2007; VILLELA et al., 2010).

A identificação de alterações no DNA por HRMA é realizada através da observação da distorção que ocorre na curva de dissociação de amostras na forma de

heterodúpliques, quando comparadas a amostras controle de homozigotas. As regiões de Tm das sequências de DNA são medidas adequadas para análise da curva de dissociação, sendo possível observar o formato da curva para cada indivíduo, com diferentes formas alélicas (WITTWER et al., 2003; GRAHAM et al., 2005).

Para eficácia dos ensaios HRMA é necessário a utilização de equipamentos com elevada intensidade e sensibilidade óptica; captura de dados com rapidez; controlo rigoroso e muito preciso; análise de fragmentos de DNA até 250 pb (produtos maiores podem ter menor resolução); utilização de amostra suficiente; manutenção das concentrações das amostras similares; uniformidade no volume entre as amostras e conteúdo CG (ERALI et al., 2008; SMITH et al., 2009).

Para cada sequência de DNA existe uma curva e temperatura de dissociações específicas, o que demonstra uma ampla aplicação para a metodologia como: detecção de mutações, triagem de heterozigotos, genotipagem, caracterização de blocos de haplótipos, análise de metilação de DNA, mapeamento de DNA, prevalências alélicas numa população e identificação de espécies (HERRMAN et al., 2007; VILLELA et al., 2010).

### 3. OBJETIVO

#### 3.1. Objetivo Geral

Selecionar genes candidatos para conteúdo de óleo em soja, identificar SNPs nestes genes e validá-los como marcadores associados ao conteúdo de óleo.

#### 3.2. Etapas

- Pesquisar genes candidatos no banco de dados da soja (soybase) relacionados ao conteúdo de óleo a partir de informações de QTLs pré-existentes para teor de óleo;
- Analisar as possíveis cópias dos genes, no programa phytozome, observando todas as características possíveis;
- Alinhar sequências peptídicas entre as cópias de genes, utilizando o programa clustalW;
- Analisar a expressão (Northern eletrônico) dos genes candidatos para conteúdo de óleo, utilizando a ferramenta blast local baixada do NCBI;
- Construir *primers* a partir dos genes expressos, observados no Northern eletrônico;
- Amplificar os *primers* em DNA de indivíduos contrastantes para o teor de óleo;
- Purificar e sequenciar os produtos dos PCRs;
- Analisar polimorfismos (SNPs) entre indivíduos contrastantes para teor de óleo;
- Validar os *primers*, utilizando a metodologia de HRM, em uma população de RILs do programa de melhoramento da qualidade da soja em desenvolvimento no BIOAGRO/UFV.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Seleção de Genes Candidatos e Identificação de Polimorfismos

Para a identificação de SNPs foram efetuadas pesquisas *in silico* com o intuito de identificar sequências codificadoras de genes envolvidos na via de biossíntese de ácidos graxos, denominados de genes candidatos, para isso foi executado os seguintes passos.

#### 4.1.1. Pesquisa no banco de dados da soja (soybase)

Foi realizada uma busca no banco de dados da soja por QTLs associados ao conteúdo de óleo. Pesquisaram-se informações completas dos QTLs, como: o loco, marcadores moleculares associados ao loco, marcadores flanqueadores do loco, grupo de ligação e posição do QTL no genoma. A partir destas informações, foi possível uma busca no genoma da soja para encontrar genes flanqueadores do marcador molecular, e em seguida foi realizado uma pesquisa na literatura para encontrar os genes relacionados com a biossíntese de ácidos graxos. Para os genes envolvidos na via metabólica dos ácidos graxos, as sequências genômicas disponíveis no soybase foram selecionadas.

#### 4.1.2. Análise no Phytozome

O programa phytozome foi utilizado para verificar em quais grupos de ligação o gene de interesse, selecionado no soybase, está presente. Sequências com o valor de *e-value* até -80 foram selecionadas, atentando-se para analisar todas as características disponíveis para cada gene, como: sequência genômica, transcrita, traduzida (ESTs) e peptídica.

#### 4.1.3. Alinhamento no ClustalW

Foi realizado um alinhamento a nível peptídico na ferramenta clustalW das cópias de cada gene para verificar o nível de identidade entre as sequências.

#### 4.1.4. Análise *in silico*

Obteve-se o pacote de instalação do programa Blast local do NCBI e bibliotecas de cDNA da soja no soybase, para realizar um Northern eletrônico com as sequências selecionadas do alinhamento com o clustalW. Para esta análise, foi utilizado sequências expressas (ESTs) para cada gene. As bibliotecas utilizadas para realizar o blast foram selecionadas, nas que possivelmente conteriam sequências relacionadas à via de biossíntese de ácidos graxos, como as bibliotecas de semente, vagem, cotilédone e folha.

#### 4.1.5. Desenho dos *Primers*

Baseado no resultado do Northern eletrônico foram selecionados apenas as sequências expressas para realizar o desenho dos *primers*. Para isto foram utilizadas sequências regulatórias 5' UTR e 3' UTR para cada gene com base nos dados de sequências das regiões pré-selecionadas disponíveis no phytozome. Foi utilizado o programa “Primer3 Input Program” para desenhar *primers* objetivando amplificar fragmentos de DNA de aproximadamente 800 a 900 pb (pares de bases). Para cada *primer* desenhado foi realizado testes *in silico* com o programa *primer select* e o programa iPCR, para testar a viabilidade destes.

#### 4.1.6. Material Genético

Foram utilizados seis genótipos parentais de soja com diferentes conteúdos de óleo na identificação dos SNPs: A7002, Suprema, CD219, PI371611, CD01RR8384 e CD222.

No processo de validação dos SNPs foi utilizada uma população de RILs na geração F7. Para a obtenção da população de RILs os genótipos Suprema e CD01RR8384 foram cruzados. Sementes F1 deste cruzamento foram autofecundadas e desenvolvidas até a geração F7 por meio de SSD (single seed descendent). A população de RILs utilizada para genotipagem e fenotipagem era constituída de 232 indivíduos deste cruzamento.

#### 4.1.7. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método CTAB, descrito por Doyle e Doyle (1990), a partir de tecidos de folhas.

O tampão de extração de DNA foi preparado, contendo 2% v/v de CTAB, 1,4 mol/L de NaCl, 20 mmol/L de EDTA, 100 mmol/L de Tris-HCl a pH 8,0; 2% m/v de Polivinilpirrolidona sólido e 0,2% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol.

Cerca de 200 a 300 mg de folhas foram trituradas na presença de N<sub>2</sub> líquido, sendo o pó resultante transferido para microtubos, aos quais foram adicionados 700  $\mu$ L do tampão de extração. Os tubos foram agitados no vórtex por aproximadamente 20 segundos e incubados em banho-maria a 65° C por aproximadamente 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 14.000 rpm em microcentrífuga e o sobrenadante transferido para novos tubos.

Ao sobrenadante adicionou-se 700 $\mu$ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e os tubos foram invertidos suavemente e novamente centrifugados por 5 min a 14.000 rpm. Em seguida a fase aquosa foi transferida para novos tubos, realizando uma segunda desproteinização com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), transferindo novamente a fase aquosa para novos tubos. Em seguida, foi adicionado isopropanol gelado (proporção de 1:1) e incubados -20° C por uma noite. Após centrifugação por 10 min a 14.000 rpm, o precipitado resultante foi lavado uma vez com etanol 70%, e uma vez com etanol 95% e secou-se à temperatura ambiente por 15 a 20 minutos. O DNA foi ressuscitado em TE (10 mmol/L de Tris-HCl, 1 mmol/L de EDTA, pH 8,0), contendo RNase na concentração final de 60  $\mu$ g/mL e incubado em banho-maria a 37 °C por uma hora e meia.

#### 4.1.8. Reação de PCR

Todos os *primers* obtidos foram utilizados inicialmente para amplificar DNA genômico dos genótipos selecionados para teor de óleo.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador (*Eppendorf*) com um volume total de 30  $\mu$ L, contendo, Tris/KCl pH 8,3 (0,25 mM), MgCl<sub>2</sub> (50  $\mu$ M), dNTPs (2,5 mM), 5  $\mu$ M do *primer*, 30 ng de DNA e uma unidade de Taq DNA polimerase platinun.

O processo de amplificação foi realizado com um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos e posteriormente seguiu um programa de 35 ciclos, sendo que em cada ciclo ocorre: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos, alongação a 72°C por 30 segundos e a extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,7% imersos em tampão TBE 1x (Tris-base, ácido bórico e EDTA), a 100 volts durante 2 horas. *Primers* que geraram apenas um produto de amplificação foram selecionados para as análises de polimorfismos.

#### 4.1.9. Purificação da reação de PCR e Sequenciamento de DNA

Para a purificação do produto da reação de PCR, foi utilizado 7,2 µl da enzima *ExoSAP IT* para 18 µl do produto da reação de PCR, posteriormente, foi incubado à 37°C durante 15 minutos (para ocorrer a degradação do excesso de *primers* e nucleotídeos) e à 80°C por 15 minutos (para a inativação da enzima).

Em seguida os fragmentos foram encaminhados para sequenciamento na Macrogen - Korea. As reações de sequenciamento foram baseadas na técnica de terminação em cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs), descrita por SANGER et al. (1977).

As seqüências forward e reverse, para cada genótipo, foram montadas usando o programa sequencher 4.1.4 (Gene Codes Corporation) e a seqüência consenso foi utilizada no alinhamento com programa clustal W para verificar as base polimórficas entre os indivíduos parentais contrastantes para conteúdo de óleo.

## 4.2. Processo de Validação dos SNPs

### 4.2.1. Processo de Genotipagem

Foi utilizado a metodologia HRM com o uso do aparelho PCR em tempo real da Qiagen (RotorGene) e Kit HRM desenvolvido pela Qiagen com corante EVAGreen. Para esta técnica, *primers* específicos foram sintetizados no programa “Primer3 Input Program”, seguindo os padrões descritos na literatura para HRM,

com T<sub>m</sub> acima de 56°C, tamanho do produto de amplificação entre 80 a 220 pares de bases (abrangendo apenas a área polimórfica) e conteúdo de G/C acima de 40%.

As reações do PCR para HRM foram realizadas com um volume total de 25 µL, contendo 2x HRM PCR, 10 µM de *primer*, 30 ng de DNA e água livre de RNase.

O processo de amplificação foi realizado com um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos e, posteriormente, seguiu um programa de 40 ciclos, sendo que em cada ciclo ocorre desnaturação a 95° C por 30 segundos, anelamento a 60° C por 30 segundos e alongação a 72 ° C por 30 segundos.

Ao final da reação foi gerada uma curva de dissociação para cada genótipo, baseado na T<sub>m</sub> de cada sequência gênica com os respectivos polimorfismos.

#### 4.2.2. Processo de Fenotipagem

As determinações dos teores de proteína e óleo da população de RILs foram feitas no Laboratório de Análises Bioquímicas /BIOAGRO/UFV. Sendo coletados 10 g de sementes de cada progênie. As sementes foram trituradas em um moinho de forma a gerar granulometria adequada para leitura em espectrômetro do infravermelho próximo (FT-NIR, equipamento Thermo Scientific, modelo Antaris II).

#### 4.2.3. Análises estatísticas

Foi realizado a análise de segregação de cada marcador por meio do teste qui-quadrado ( $P < 0,05$ ) utilizando o critério de Proteção Bonferroni.

Para avaliar se os dados fenotípicos apresentavam distribuição normal, foi utilizado o teste de normalidade, empregando teste de assimetria (s), teste de curtose e teste de Lilliefors.

As análises dos dados moleculares de associação com caracteres quantitativos na população de RILs em busca de QTL foram realizadas por meio de mapeamento por marcas simples, empregando a análise de variância (ANOVA).

Todas as análises estatísticas apresentadas neste trabalho foram avaliadas por meio do aplicativo computacional GQMOL (SCHUSTER e CRUZ, 2004) desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3. Seleção de Genes Candidatos e Identificação de Polimorfismos

Foram selecionados oito QTLs no banco de dados da soja (soybase) relacionados ao conteúdo de óleo, baseado nos maiores valores do coeficiente de determinação ( $R_2\%$ ) (Tabela 1). Segundo Shoemaker et al. (2008) existem mais de mil locos de características quantitativas (QTL) mapeados em soja e mais de 120 para conteúdo de óleo reportados em todos os 20 grupos de ligação (Qi et al., 2011; Soybase, 2012).

Tabela1: Características genéticas de QTLs para conteúdo de óleo no mapa genômico da soja.

<b>QTL</b>	<b>Loco</b>	<b>Marcadores flanqueadores</b>	<b>LG</b>	<b>Cr</b>	<b><math>R_2\%</math></b>	<b>Posição</b>
Oil 2-7	A023_1	Satt613 - Satt284	L	19	22	36.70
Oil 9-3	A489_1	Satt229 - BARC-021321-04035	L	19	19	95.37
Oil 2-6	A242_1	Sat_287 - BARC-015539-01995	B2	14	20	33.13
Oil 2-5	SAC7_1	BARC-031269-07029 - BARC-042629-08331	E	15	23	06.30
Oil 2-3	GENE_Pb	Satt411 - BARC-008231-00112	E	15	27	13.60
Oil 2-8	K229_1	BARC-020075-04435 - BARC-014819-01679	E	15	22	28.27
Oil 2-4	A454_1	BARC-014819-01679 - Satt651	E	15	23	30.89
Oil13-1	B170_1	Satt511 - Satt225	A1	5	18	94.92

\*LG - grupo de ligação; Cr - cromossomo

A Cada QTL estão associadas informações que facilitam a busca no genoma por genes relacionados ao conteúdo de óleo. Como, por exemplo, os locos gênicos com as informações quantitativas, os marcadores moleculares que estão flanqueando cada loco, o grupo de ligação e o cromossomo em que o QTL está presente, com uma possível posição no genoma. David et al. (2010) apresentaram a importância do soybase, demonstraram todos os caminhos para seu uso, explicaram que as informações genéticas contidas no soybase são importantes para realizar vários estudos com *G. max*, confirmando as escolhas para o direcionamento das pesquisas deste trabalho.

A partir das informações mencionadas na Tabela 1 foi possível realizar uma busca no genoma da soja para genes relacionados à biossíntese de ácidos graxos (Tabela 2). Foram encontrados 25 genes, tendo alguns QTLs com maiores

quantidades de informações gênicas para biossíntese de lipídeos, como por exemplo, o oil2-5 que está presente no cromossomo 15, com 6 genes.

Tabela 2: Genes relacionados à via de biossíntese de ácidos graxos próximos a QTLs para conteúdo de óleo em soja.

QTLs	Genes selecionados
oil 2-7	Domínio AP2; Domínio B3
oil 9-3	Domínio WRKY; Domínio Myb
oil 2-6	Acil transferase, WD40
oil 2-5	Oxoacil; Domínio WRKY; Domínio AP2 Domínio MYC; WD40; Acetil CoA carboxilase
oil2-3	Acilglicerol; Dof mRNA; Oxisterol; Oxoacil
oil2-8	WD40; Proteína carreadora de Acil
oil2-4	MADS; GDSL; Fator bZIP73B
oil 13-1	N-MYC; Domínio Myb; Acetil-CoA carboxilase Carboxilase:Piruvate/Acetil-Coa/Propionil-Coa

Muitos estudos descreveram o envolvimento de genes na acumulação de óleo em plantas, como os trabalhos de Mihalik et al. (2002); Häder et al. (2003); Oswald et al. (2004); Mendoza et al. (2005); Wang et al. (2007); Durret et al. (2008); Dyer et al. (2008); Mendonza et al. (2008); Baud e Lepiniec (2010); Morrish et al. (2010); NGO et al. (2010); Shi et al. (2011). Estas pesquisas foram importantes para seleção dos genes estudados no presente experimento.

A partir das sequências genômicas dos 25 genes foram realizadas análises no Phytozome para verificar quantas cópias existiam para cada gene no genoma. Foi encontrado mais de uma cópia para cada um dos genes e com a análise do alinhamento de cada conjunto de cópias pelo programa ClustalW foi selecionada apenas a sequência originalmente obtida no soybase e também aquela que apresentou uma alta identidade na sequência peptídica com a mesma.

O *site* Phytozome é um banco de dados que oferece acesso a famílias de genes individuais de 18 genomas de plantas. Similaridade de sequência e busca baseada em palavras-chave podem ajudar a identificar genes e famílias de genes de interesse e facilitar vários estudos (PHYTOZOME WORKSHOP, 2010).

Para a maioria dos 25 genes foram selecionadas duas sequências, com exceção de três dos genes (Acil Glicerol 3-fosfato aciltransferase, WRKY e WD40), pois para estes todas as cópias apresentaram menor que 50% de identidade no alinhamento peptídico. Os 25 genes foram analisados por northern eletrônico, e

destes, apenas 14 foram expressos (Tabela 3). Dez deles codificam fatores de transcrição ou domínios gênicos que participam da via de biossíntese de ácidos graxos e quatro são genes envolvidos diretamente na biossíntese (Oxoacil, Acetil CoA carboxilase, carboxilase e proteína carreadora de acil).

Segundo Durret et al. (2008) a identificação de fatores de transcrição e a compreensão dos mecanismos que controlam a biossíntese de óleo em plantas é a base do sucesso na engenharia genética para teor de óleo, em tecidos de plantas. Mendoza et al. (2008), relatam que as principais vias metabólicas da biossíntese de ácidos graxos, estão bem caracterizadas, entretanto, a sua regulação, envolvendo os fatores de transcrição e domínios genéticos, ainda não estão claros. Diversos fatores de transcrição, suas interações e seus genes-alvo continuam a ser caracterizados. Estes estudos são muito importantes, uma vez que análises na sequência genômica dos genes envolvidos na biossíntese podem fornecer informações necessárias para compreensão dos mecanismos envolvidos no aumento do teor de óleo, como a descoberta de alterações nucleotídicas (SNPs).

Tabela 3: Genes expressos em diferentes bibliotecas utilizando a ferramenta Blast local.

<b>Genes Expressos</b>	<b>Transcritos dos genes</b>	<b>Código</b>
Oxoacil	Glyma15g00550 e Glyma09g41380	4 e 5
Acetil CoA carboxilase	Glyma05g36450 e Glyma08g03120	8 e 9
Carboxilase	Glyma05g36450 e Glyma08g03120	14 e 15
Dof	Glyma15g04430	16
Domínio MYC	Glyma15g00750 e Glyma13g44570	26 e 27
Domínio WRKY	Glyma15g00570 e Glyma13g44730	28 e 29
Domínio WRKY	Glyma19g37570	30
GDSL	Glyma15g09520 e Glyma13g29500	31 e 32
Domínio Myb	Glyma05g36290 e Glyma08g03330	35 e 36
NMYC	Glyma05g36270 e Glyma08g03360	37 e 38
Oxisterol	Glyma11g14770	40
WD40	Glyma15g00880	41
WD40	Glyma15g10650 e Glyma13g28430	44 e 45
Proteína carreadora de acil	Glyma15g10520 e Glyma13g28590	46 e 47

A Tabela 4 mostra os resultados do Northern eletrônico de acordo com as bibliotecas de cDNA utilizadas. Verifica-se que poucos genes foram expressos nas bibliotecas de cDNA de vagem e semente e que muitos tiveram expressão nas bibliotecas de cotilédone e folha, sendo o padrão de expressão bastante variável.

Tabela 4: Expressão dos genes de acordo com as bibliotecas de cDNA.

GENES/ cDNA		4	5	8	9	14	15	16	26	27	28	29	30	31	32	35	36	37	38	40	41	44	45	46	47		
<b>Vagem e Semente</b>	A																										
	B																										
	C																										
<b>Cotilédone</b>	D																										
	E																										
	F																										
	G																										
	H																										
	I																										
	J																										
	K																										
	L																										
	<b>Folha</b>	M																									
		N																									
		O																									
P																											
Q																											
R																											
S																											
T																											
U																											
V																											
X																											
Z																											
W																											

\*Números 4 - 47: código dado aos genes; Letras A-W: código dado às bibliotecas de cDNA.

A maioria dos genes foi detectada apenas uma vez de acordo com as bibliotecas utilizadas para análise do Northern eletrônico (Figura 1). Entretanto, verificou-se que algumas sequências foram detectadas mais de uma vez, como na biblioteca J (cotilédone), em que o gene GDSL (32) foi detectado quatro vezes, assim como o gene WRKY (28 e 29) na biblioteca de folha (V) e o gene WD40 (44 e 45) na biblioteca de folha (W). Alguns genes também foram detectados duas vezes, como os genes 46 e 47 da biblioteca H, o gene 41 nas bibliotecas K, M, T e U, o gene 35 na biblioteca P e o gene 28 nas bibliotecas N e Z (Figura 1).

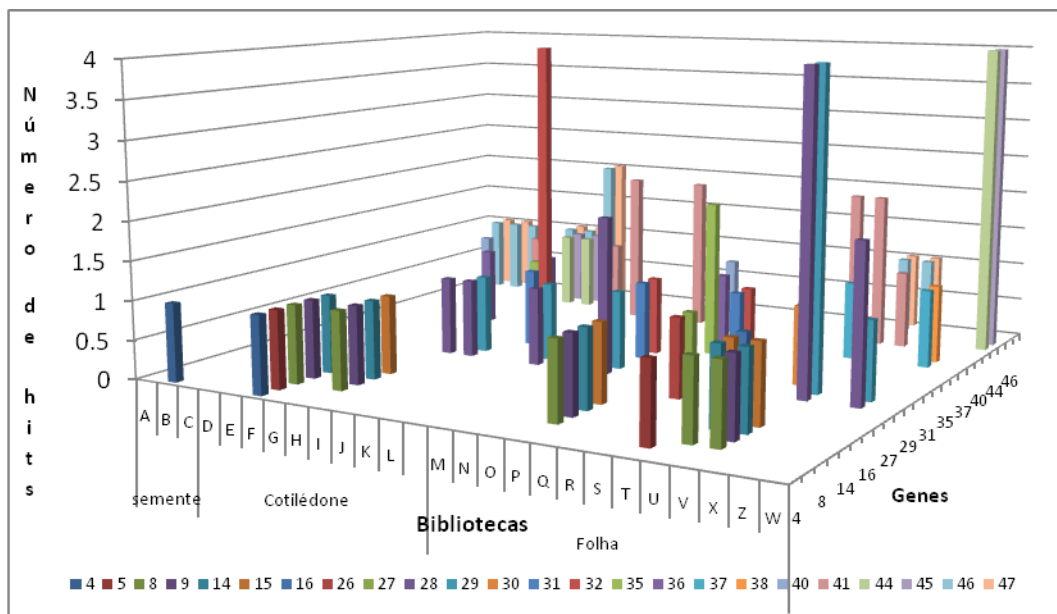


Figura 1: Detecção das seqüências dos genes relacionados à biossíntese de ácido graxo em número de hits nas bibliotecas de cDNA da soja.

Em concordância com as análises de expressão realizadas neste trabalho, Rafalski et al. (1998) descreveram que estas permitem avaliar a abundância das seqüências ESTs em cada uma das bibliotecas de cDNA, verificando quantas vezes cada tipo de cDNA é detectado. Hufford et al. (2007), analisando genes de milho de cultura selvagem e melhoradas, através do northern eletrônico, constataram que os genes das culturas melhoradas tiveram maior expressão nas espigas de milho do que em relação a folha e raiz, com isso demonstraram que características alvo de seleção no melhoramento são mais propensos a ser expressos em tecidos. Lima et al. (2011) fizeram uma busca no banco de dados do café (CAFEST) por seqüências expressas relacionadas com os elementos conhecidos da via de sinalização de etileno e com a análise no northern eletrônico, verificaram a expressão dos genes em vários tecidos, fases do desenvolvimento e em condições de stress.

Os resultados obtidos neste trabalho foram importantes para dar prosseguimento aos experimentos subsequentes, uma vez que apenas os genes detectados nas bibliotecas de cDNA (Tabela 3), foram selecionados para a análise de polimorfismo (SNPs) entre os genótipos contrastantes para teor de óleo (Tabela 5).

Tabela 5: Número de polimorfismos entre os genes

Genes	Polimorfismo	Genes	Polimorfismo
accC2-8-3	2	Myc-15-3	1
carboxylase-8-3	2	NMyc-5-3	2
GDSL-15-3	5	Oxoacyl-13-3	1
GDSL-15-5	6	WD40R-15-3	8
Myb-5-3	1	WD40R-15-5	4
Myb-5-5	2	WRKY-19-3	9
Myc-13-3	1	WRKY-19-5	7
Myc-13-5	1		
Soma			52

Foram observados um total de 52 alelos polimórficos, tendo destaque para os genes WRKY-19-3 e WD40R-15-3, com 9 e 8 bases polimórficas respectivamente. Shu et al. (2010), com intuito de descobrir SNPs em soja, utilizaram sequências EST do genoma inteiro e através da técnica de pirosequenciamento, identificaram 3899 SNPs amplamente distribuídos no genoma da soja, sendo a maioria distribuídos em genes envolvidos em processos fisiológicos e bioquímicos, influenciando em importantes características agrônomicas. Würschum et al. (2012) detectaram 253 SNPs em diversos QTLs, incluindo tempo de florescimento, altura da planta, teor de proteína, teor de óleo, teor de glucosinolatos e rendimento de grãos em *Brassica napus*. Wang et al. (2012) trabalhando com *Phytophthora sojae*, analisaram 153 genes e identificaram 1025 SNPs.

#### 4.4. Genotipagem, Fenotipagem e Validação dos genes polimórficos na população de RILs

Os genes polimórficos, entre os genótipos parentais Suprema e CD01RR8384, foram selecionados para análises e baseando-se na metodologia de genotipagem HRMA, os *primers* nestes foram desenhados (Tabela 6). Verificou-se que a maioria dos SNPs é do tipo transversão (substituição das bases de purina por pirimidina), havendo alguns genes do tipo transição, com substituição de base do tipo purina por purina, como os genes GDSL-15-33, Myb-5-3 e WRKY-19-5 e também um gene com deleção (GDSL-15-33) (Tabela 6). Os genótipos parentais que apresentaram essas variações de nucleotídeos nas sequências de bases foram utilizados como controle para realização da genotipagem HRMA e os *primers* foram utilizados na população de RILs derivada do cruzamento Suprema x CD01RR8384.

Tabela 6: *Primers* sintetizados para genotipagem HRMA.

Primer	SNP	Sequência do primer F/R	Tamanho PCR (pb)	% G/C	Tm °C
GDSL-15-31	T/G	TCATGGAATGCAGGGACAAT	143	45	60
		ATGGCAGATGCTGTTTTTCA		40	
GDSL-15-33	C/G; G/A; -/A	TCAAGGGAATATGGACCACAA	216	42.86	60
		CACAACCCATCGTTGAAACA		45	
Myb-5-3	G/A	GGAATGATCAGATCCCTTCAA	165	42.86	60
		CTGGAATTTGGATCCCACAG		50	
Myc-15-3	T/A	CTTCCCCTTTGAAATACATCAC	191	40.91	57
		GTGCATTAAAGTGTGTTCTTGG		40.91	
WRKY-19-5	A/T; G/A	TTTCACTGCTATGGTCTGTTTA	200	36.36	55
		CAAAAACATCCTGTTATTTTCA		29.17	
NMyb-5-3	G/T; A/C	GATCCCATTTGCAGCTGACT	124	50	58
		GCGTGTTFACCTTGCTTTGGA		45	

Após a amplificação do DNA por PCR em tempo real e com a geração da curva de dissociação, foi possível analisar o padrão de bases polimórficas na população baseando-se nos controles utilizados em cada reação (Figura 2).

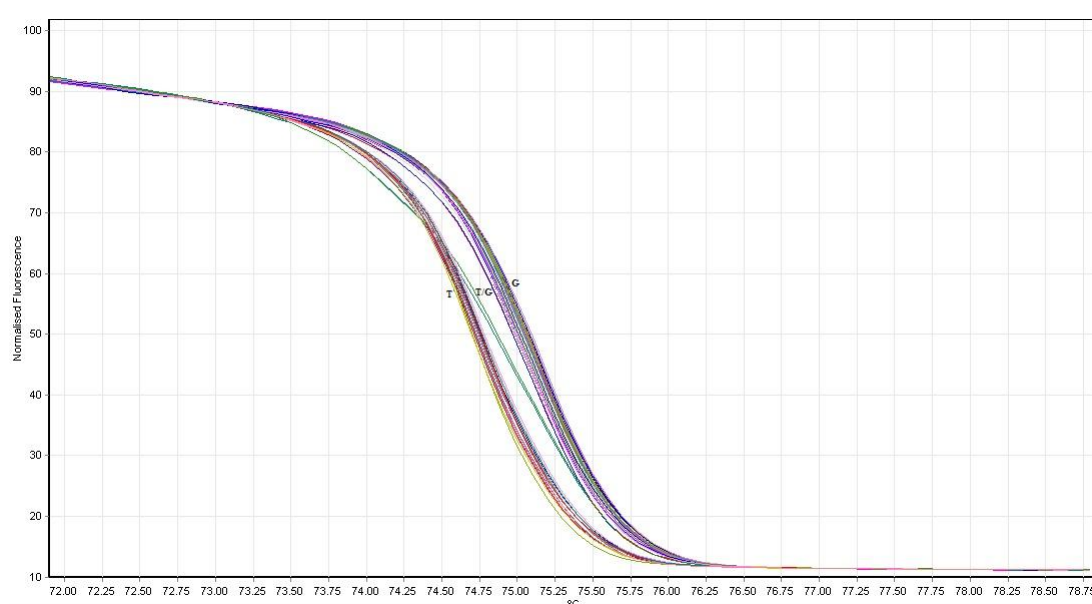


Figura 2: Curva HRMA para o *primer* GDSL-15-31 com polimorfismos T e G. Cada linha representa um indivíduo, com CD01RR8384 (base T) e Suprema (base G).

Os indivíduos que apresentam apenas a base nitrogenada A ou G, são homozigotos e os que apresentam A/G são heterozigotos.

Wittwer et al. (2003) descreveram que diferentes homozigotos apresentam a mesma forma da curva de dissociação, porém a Tm é diferente e que os heterozigotos possuem formas diferentes e a Tm é verificada na região de transição entre os homozigotos. Este padrão pode ser observado na Figura 2, com a base T e G

homozigotas e a curva T/G heterozigota, demonstrando com exatidão o perfil descrito na literatura para a metodologia HRMA e a eficiência na distinção dos SNPs. Considerando que esta técnica ainda não foi reportada na literatura para a soja, salienta a importância deste experimento na genotipagem de soja.

Até mesmo para o gene Myc-15-3, com SNP do tipo A e T, que possuem uma pequena diferença na  $T_m$ , aproximadamente  $0.2^\circ\text{C}$ , a metodologia foi eficiente. Liew et al. (2004) explica que a separação da curva nesta situação é dificultada, mas o aparelho Rotor-Gene, que foi utilizado neste trabalho, é sensível para identificação desse  $T_m$  (Figura 3).

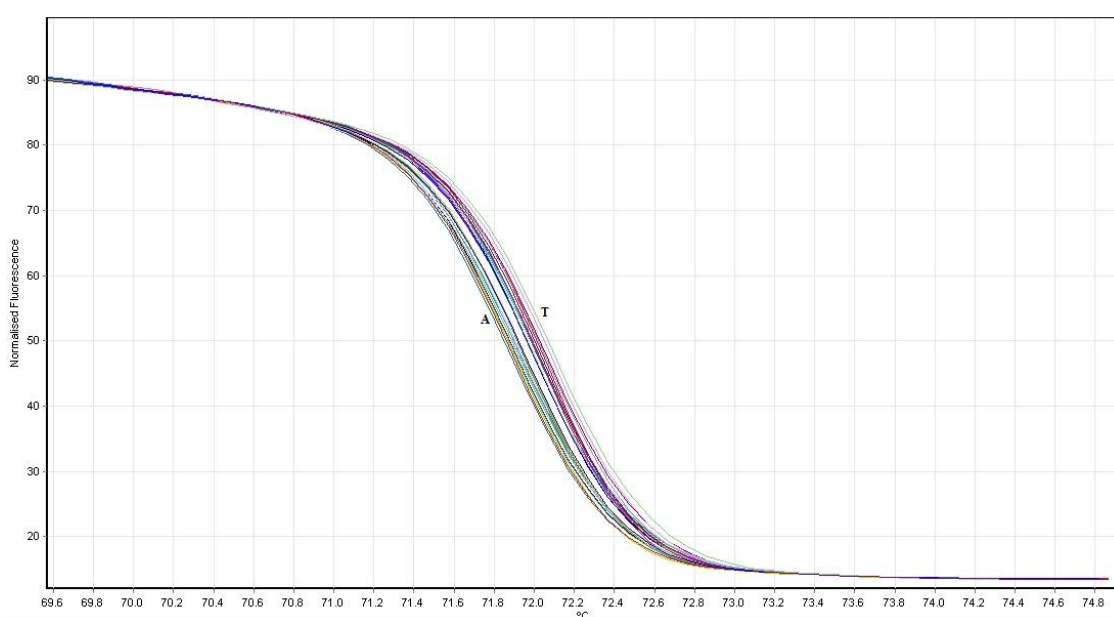


Figura 3: Curva HRMA para o *primer* Myc-15-3 com polimorfismo A/T. Cada linha representa um indivíduo, com CD01RR8384 (base A) e Suprema (base T).

Foi observado também que para uma separação eficaz com um padrão de curva nítido, as condições de amplificação dos *primers* descritos na metodologia HRMA são bastante significativas. Como por exemplo, para o gene WRKY-19-5 só foi possível desenhar *primers* com  $T_m$  de  $55^\circ\text{C}$  e %G/C de 29% e 36% (Tabela 6), sendo o ideal  $T_m$  acima de  $56^\circ\text{C}$  e %G/C acima de 40%. Como resultado, obteve-se curvas mais espaçadas, sem um padrão no formato da curva para distinguir as bases nitrogenadas A e G dos SNPs (Figura 4).

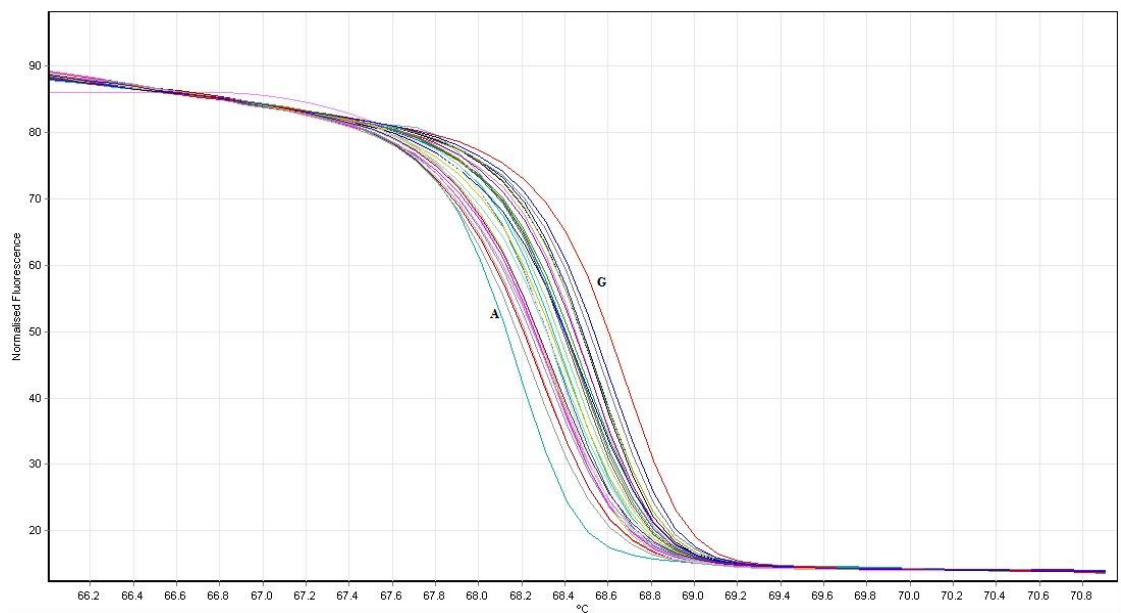


Figura 4: Curva HRMA para o *primer* WRKY-19-5 com polimorfismo A/G. Cada linha representa um indivíduo, com CD01RR8384 (base A) e Suprema (base G).

Erali et al. (2010) demonstraram que baixo conteúdo de G/C pode gerar curva de dissociação em múltiplos estágios, uma vez que a desnaturação da dupla fita é facilitada em regiões ricas em A/T, devido a facilidade do rompimento das ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, e isso pode gerar padrões diferenciados da curva, como verificado na Figura 4.

Com a genotipagem, foi possível mensurar a frequência dos SNPs na população, determinando o perfil de homozigose e heterozigose. Para isto foi utilizado o teste de segregação de cada marcador por meio do teste qui-quadrado ( $P < 0,05$ ) utilizando o critério de Proteção Bonferroni. Todos os marcadores genotipados na população de mapeamento seguiram o padrão esperado de segregação 1:1 (Tabela 7).



existência de variação contínua e a possibilidade de que vários genes estejam envolvidos no controle destas características nestas populações, possibilitando o emprego de métodos de estimação de QTLs e testes estatísticos de significância que pressupõe uma distribuição normal dos dados.

Tabela 8: Estimativas dos valores de curtose, simetria e D para a distribuição dos caracteres teor de óleo e proteína da população de RILs.

<b>População de RIL Suprema X CD01RR8384</b>			
<b>Teor de proteína</b>			
	<b>Curtose</b>	<b>Simetria</b>	<b>D<sup>(1)</sup></b>
Estimativa	3.813	0.1812	0.05996 <sup>ns</sup>
Variância	0.025	0.0251	-
Valor de t	2.577	1.144	-
Probabilidade (%)	0.983	25.18	>1.00% <5.00%
<b>Teor de óleo</b>			
Estimativa	3.44*	-0.386	0.576 <sup>ns</sup>
Variância	0.025	0.025	-
Valor de t	1.41	-2.44	-
Probabilidade (%)	15.49	1.44	>1.00% <5.00%

(1) Estatística D para o Teste de Lilliefors.

(\*) Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t; (ns) – Não significativo pelo teste t.

Após análise da população baseada na genotipagem e fenotipagem (conteúdo de óleo e proteína), foi realizado teste associativo marcador e característica para verificar se as variações genotípicas (polimorfismos) (Tabela 5) dos genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos estariam associadas à variação no conteúdo de óleo. Como resultados, para todos os genes estudados, a análise estatística foi não significativa, tanto para conteúdo de óleo quanto para conteúdo de proteína (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9: Análises de associação de SNP com conteúdo de óleo na população de RILs por meio de mapeamento por marcas simples, empregando a análise de variância (ANOVA).

<b>QTL</b>	<b>primers</b>	<b>F calculado</b>	<b>Média (2)</b>	<b>Média (0)</b>
oil2-4	GDSL-15-31	0.4019 <sup>ns</sup>	22.5675 <sup>a</sup>	22.6415 <sup>a</sup>
	GDSL-15-33	0.4564 <sup>ns</sup>	22.6945 <sup>a</sup>	22.3922 <sup>a</sup>
oil13-1	N-Myc-5-3	0.7898 <sup>ns</sup>	22.4658 <sup>a</sup>	22.7579 <sup>a</sup>
oil2-5	Myc-15-3	0.1541 <sup>ns</sup>	21.5228 <sup>a</sup>	21.6017 <sup>a</sup>
oil9-3	Myb-5-3	0.3772 <sup>ns</sup>	22.5694 <sup>a</sup>	22.5384 <sup>a</sup>

\* ns: não significativo; a: demonstra a igualdade entre as médias.

\*\* O número 2 corresponde ao alelo do indivíduo parental Suprema e 0 corresponde ao alelo do indivíduo parental CD01RR8384.

Tabela 10: Análises de associação de SNP com conteúdo de proteína na população de RILs por meio de mapeamento por marcas simples, empregando a análise de variância (ANOVA).

QTL	primers	F calculado	Média (2)	Média (0)
oil2-4	GDSL-15-31	0.0422 <sup>ns</sup>	36.0844 <sup>a</sup>	36.0483 <sup>a</sup>
	GDSL-15-33	0.0830 <sup>ns</sup>	36.4233 <sup>a</sup>	36.4559 <sup>a</sup>
oil13-1	N-Myc-5-3	0.0977 <sup>ns</sup>	36.4576 <sup>a</sup>	36.2336 <sup>a</sup>
oil2-5	Myc-15-3	0.4085 <sup>ns</sup>	37.1192 <sup>a</sup>	36.8962 <sup>a</sup>
oil9-3	Myb-5-3	0.07105 <sup>ns</sup>	36.3794 <sup>a</sup>	36.4594 <sup>a</sup>

\* ns: não significativo; a: demonstra a igualdade entre as médias.

\*\* O número 2 corresponde ao alelo do indivíduo parental Suprema e 0 corresponde ao alelo do indivíduo parental CD01RR8384.

Como pode ser observado nas Tabelas 9 e 10, as médias entre as marcas polimórficas foram muito semelhantes, não houve uma relação de SNP com indivíduos de maior ou menor porcentagem fenotípica, as marcas distribuíram-se aleatoriamente na população, independente do conteúdo de óleo e proteína.

Outros pesquisadores conseguiram relacionar polimorfismos SNPs com a análise fenotípica. Gupta et al. (2004), com a identificação dos SNPs foi possível realizar o mapeamento dos genes candidatos para ácidos graxos em *Brassica juncea* em populações contrastantes para identificação de QTLs. Xueyi et al. (2006) comparando alelos dos genes das dessaturases FAD2 e FAD3C entre indivíduos selvagens e mutantes de canola, encontraram um SNP em cada sequência, que foram responsáveis pelo aumento do teor de ácido oléico e a diminuição do teor em ácido linolênico na linhagem mutante. Liu et al. (2011), desenvolveram marcadores SNPs para 3 genes de oleosina em *Jatropha* (pinhão manso), que controlam o conteúdo dos ácido graxos oléico e esteárico e mapearam QTLs em mapas de ligação.

Não foi identificado na literatura pesquisas associando marcadores SNPs com teor de óleo e proteína em soja, entretanto existem muitos estudos publicados, com este objetivo, utilizando marcadores RFLP e SSR.

Hyten et al. (2004), com objetivos de identificar QTLs representativos para conteúdo de óleo, proteína e tamanho da semente de soja, utilizaram uma população de RILs em F<sub>6</sub>, com 131 indivíduos, cultivada em seis ambientes diferentes, oriunda do cruzamento entre 'Essex' e 'Williams'. Analisaram 100 marcadores moleculares microssatélites (SSR) e identificaram quatro QTLs para proteína, seis para óleo e sete para tamanho da semente. Mahmood et al. (2006), utilizando marcadores RFLP, identificaram seis QTLs para conteúdo de óleo e cinco para conteúdo de proteína em canola. Han et al. (2011), testaram QTLs versus variação ambiental em população de

RILs em  $F_{5:8}$  e  $F_{5:9}$ , com 125 indivíduos, derivadas do cruzamento de 'Hefeng 25' e 'Dongnong L5' para ácido linolênico, verificaram que os efeitos da interação ambiental influenciam na identificação de QTLs em diferentes fases de desenvolvimento da soja. Mehrzad et al. (2013), utilizaram duas populações de RILs de soja, derivadas de cruzamentos entre três cultivares com teor de óleo moderadamente alto (OAC Wallace, OAC Glencoe, e RCAT Angora). As populações de RILs foram cultivadas em ambientes diversos ao longo de 2 anos, em Ontário e Canadá. Para associar as características genotípicas com as fenotípicas, utilizaram 555 pares de *primers* microssatélites (SSR) e descobriram um total de 11 regiões genômicas em nove diferentes cromossomos com associação ao conteúdo de óleo.

Analisando os trabalhos descritos acima, verifica-se que para associar marcas genéticas com características fenotípicas, a maioria das pesquisas utilizam populações de RILs cultivadas em ambientes diversos e demonstram que o meio ambiente influenciam na detecção dos QTLs. Estes resultados podem auxiliar no esclarecimento da não existência da correlação esperada neste estudo, uma vez que foram utilizados uma população de RILs não foi cultivada em ambientes diferentes.

Por outro lado, Fasoula et al. (2004), comprovaram existir algumas inconsistências de informações dos QTLs relatados no soybase para proteína, óleo e peso da semente. Verificaram que de três QTLs para conteúdo de óleo apenas dois estavam associados com a característica e em outra população de três QTLs apenas um estava associado. Concluíram que existem QTLs falsos positivos depositados no banco de dados da soja e confirmam a necessidade de validá-los.

Atentando-se que o presente experimento foi baseado em QTLs depositados no soybase (Tabela 1), existe a possibilidade de ter sido selecionado QTLs de pequeno efeito ou que não possuem influências quantitativas na população estudada.

## 5. CONCLUSÕES

- Foi possível selecionar 25 genes relacionados à biossíntese de lipídeos em soja no soybase e através do Northern eletrônico, 14 foram expressos em bibliotecas de cDNA de folha, semente, cotilédone e vagem;
- Na análise de polimorfismos para os 14 genes, foi encontrado 52 SNPs;
- A genotipagem HRM foi eficiente na determinação dos SNPs na população de RILs, determinando o perfil de homozigose e heterozigose dos alelos;
- O teor de óleo na população de RILs teve uma amplitude de variação considerada alta 19,86% a 25,31% (diferença de 5,45%);
- Realizando a validação dos SNPs na população, não foi possível relacionar polimorfismos com as variações fenotípicas. Os SNPs distribuíram-se aleatoriamente, independente do conteúdo de óleo.
- A não correlação verificada pode ser devido ao não cultivo da população de RILs em ambientes diferentes e a possibilidade de ter sido selecionado QTLs de pequeno efeito no soybase.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSORGE, W. J. Next-generation DNA sequencing techniques. **New Biotechnology**. v. 25, n. 4, 2009.
- ANTHONY, A.; MILLAR, M. A. S.; LJERKA, K. All fatty acids are not equal: discrimination in plant membrane lipids. **Trends in plant science**. v. 5, n. 3, 2000.
- ARAÚJO, M. M. Melhoria de plantas visando à produção de biodiesel. programa de pós-graduação em genética e melhoria de plantas. Seminários em Genética e Melhoria de Plantas. 2006. Disponível em: <<http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/MMAraujo-200702-Resumo.pdf>> Acesso em: 10 nov. 2012.
- BAUD, S. et al. Storage reserve accumulation in Arabidopsis: metabolic and developmental control of seed filling. **The Arabidopsis Book**. American Society of Plant Biologists, p. 1-24, 2008.
- BAUD, S.; LEPINIEC, L. Physiological and developmental regulation of seed oil production. **Progress in Lipid Research**. 2010.
- BENGTSSON, E. **Analysis of Swedish Accessions of *Phaseolus vulgaris* L. Using SSR Markers**. 2009. Dissertation (master's degree). Department of Plant Breeding and Biotechnology Swedish University of Agricultural Sciences, SLU.
- BLONDAL, T. et al. A novel MALDI-TOF based methodology for genotyping single nucleotide polymorphism. **Nucleic Acid Research**. v. 31, n. 24, p. 155, 2003.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006, 374 p.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoria de Plantas**. 5 ed. UFV. 2009, 529 p.
- BOTSTEIN, D.; RISCH, N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. **Nature Genetics**, v. 33, p. 228-237, 2003.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNIC, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.
- BOUCHEZ, A.; HOSPITAL, F.; CAUSSE, M.; GALLAIS, A.; CHARCOSSET, A. Marker-assisted introgression of favorable alleles at quantitative trait loci between maize elite lines. **Genetics Society of America**, v. 162, p. 1945-1959, 2002.
- CAETANO, A. R. SNP markers: basic concepts, applications in animal breeding and management and perspectives for the future. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 64-71, 2009.

CANAKCI, M.; GERPEN, J. V. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. **Transactions of the ASAE**, v. 44, n. 6, p. 1429-1436, 2001.

CAVALCANTE, A. K.; SOUSA, L. B.; HAMAWAKI, O. T. Determinação e avaliação do teor de óleo em sementes de soja pelos métodos de ressonância magnética nuclear e soxhlet. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 1, p. 8-15, 2011.

CHANG, N. W; HUANG, P. C. Effects of the ratio of polyunsaturated and monounsaturated fatty acid on rat plasma and liver lipid concentration. **Lipids** **33**, p. 481-487, 1998.

CHEN X.; SULLIVAN P. F. Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. **The Pharmacogenomics Journal**. v.3, p. 77-96, 2003.

CLEMENTE, T. E.; CAHOON, E. B. Soybean Oil: Genetic Approaches for Modification of Functionality and Total Content. **Plant Physiology**. v. 151, p. 1030-1040, 2009.

COLLINS, F. S.; BROOKS, L. D.; CHARKRAVARTI, A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. **Genome Research**. v. 8, p. 1229-1231, 1998.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 4º. Levantamento de grãos 2011/2012 (Jan, 2012). Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_01\\_10\\_10\\_53\\_02\\_boletim\\_graos\\_4o\\_levantamento.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_01_10_10_53_02_boletim_graos_4o_levantamento.pdf)> Acesso em: 10 nov. 2012.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 7º. Levantamento de grãos 2010/11 (abr, 2011). Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_04\\_07\\_11\\_02\\_42\\_boletim\\_abril-2011.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_04_07_11_02_42_boletim_abril-2011.pdf)>. Acesso em: 14 abr. 2012.

CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. GQMOL: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos. Versão 2.1. Viçosa: UFV, 2004. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

DAVID, G. et al. SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, 2010.

DAVID, L. N.; MICHAEL M. C. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed. artmed. 2010.

DESCHAMPS, S.; CAMPBELL, M. A. Utilization of next-generation sequencing platforms in plant genomics and genetic variant discovery. **Springer Science**. v. 25, p. 553-570, Dec. 2009.

DIERS, B. W. et al. RFLP analysis of soybean seed protein and oil content. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 83, p. 608-612, 1992.

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

DURRETT, T. P., BENNING, C.; OHLROGGE, J. Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. **The Plant Journal**, v. 54, p. 593-607, 2008.

DYER, J. M., STYMNE, S., GREEN, A. G. AND CARLSSON, A. S. High-value oils from plants. **The Plant Journal**, v. 54, p. 640-655, 2008.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de produção de soja - Região central do Brasil 2005**. Londrina, PR. 2004.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. XXXII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil 09 e 10 de agosto de 2011. Resumo: **Reação de genótipos de soja inoculados artificialmente com *Phakopsora pachyrizi* em condições de casa de vegetação**. São Pedro, SP. Embrapa soja, Londrina, PR. 2011.

ERALI, M.; VOELKERDING, K. V.; WITWERT, C. T. High Resolution Melting Applications for Clinical Laboratory Medicine. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 85, n. 1, p. 50-58, 2008.

ERALI, M.; WITWERT, C. T. High resolution melting analysis for gene scanning. **Methods**, v. 50, p. 250-261, 2010.

ERICKSON, D. R. Optimum and adjusted refining practices for soybean oil, in Proceedings of the World Conference on Oilseed Processing and Utilization. **Champaign**, p. 74-79, 2001.

FASOULA, V. A.; HARRIS, D. K.; BOERMA, H. R. Validation and Designation of Quantitative Trait Loci for Seed Protein, Seed Oil, and Seed Weight from Two Soybean Populations. **Crop Science**, v. 44, p. 1218-1225, 2004.

FORT-LLOYD, B. V. et al. The use of RAPD for identifying and classifying *Musa* germplasm. **Genome**, Edgbaston, v. 37, n. 2, p. 328-332, 1994.

GRAHAM, R. et al. Distinguishing Different DNA Heterozygotes by High-Resolution Melting. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 7, 2005.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à Genética**. 7 ed. Guanabara Koogan. 2002.

GRUNDY, S. M. Composition of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol. **The New England Journal of Medicine**, v. 314, p. 745-748, 1986.

GUIMARÃES, E. P. M.; COSTA, M. C. R. SNPs: Sutis diferenças de um código. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 26, p. 24-27, 2002.

GUPTA, V. et al. Molecular tagging of erucic acid trait in oilseed mustard (*Brassica juncea*) by QTL mapping and single nucleotide polymorphisms in FAE1 gene. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 743-749, 2004.

HÄDER, T. et al. Control of triglyceride storage by a WD40/TPR-domain protein. **EMBO reports**, v. 4, p. 511-516, 2003.

HAFF, L. A.; SMIRNOV, I. P. Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. **Genome Research**, v. 7, p. 378-388, 1997.

HALLAUER, A. R.; MIRANDA, J. B. Quantitative genetics in maize breeding. 2 ed. Ames: Iowa State University, 468 p., 1988.

HAN, Y. et al. Dynamic QTL analysis of linolenic acid content in different developmental stages of soybean seed. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 122, p. 1481-1488, 2011.

HERRMANN, M. G. et al. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. **Clinical Chemistry**, v. 53, p. 1544-1548, 2007.

HUFFORD, K. M. et al. Patterns of Selection and Tissue-Specific Expression among Maize Domestication and Crop Improvement Loci. **Plant Physiology**, v. 144, p. 1642-1653, 2007.

HYTEN, D. L. et al. Seed quality QTL in a prominent soybean population. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, p. 552-561, 2004.

ICEX - INDIAN COMMODITY EXCHANGE. Commodity Profile – Soy Oil. Disponível em: <[http://www.icexindia.com/profiles\\_html/soy\\_oil.html](http://www.icexindia.com/profiles_html/soy_oil.html)>. Acesso em: 10 apr. 2011.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**, v. 316, p. 76-79, 1985.

KINNEY, A. J. Genetic modification of the storage lipids of plants. **Current opinion in biotechnology**, v. 5, n. 2, 1994.

KRYPUIY, M. et al. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. **BMC Cancer**, v. 6, p. 295, 2006.

KWOK, P. Y.; GU, Z. Single nucleotide polymorphism libraries: Why and how are we building them. **Molecular Medicine Today**, v. 5, p. 538-543, 1999.

KWOK, P.Y.; DENG, Q.; ZAKERI, H.; NICKERSON, D. A. Increasing the information content of STS-based genome maps: identifying polymorphisms in mapped STSs. **Genomics**, v. 31; p.123-126, 1996.

LEE, J. D.; BILYEU, K. D.; SHANNON, J. G. Genetics and Breeding for Modified Fatty Acid Profile in Soybean Seed Oil. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 10 n. 4 p. 201-210, 2007.

LEE, S. H. et al. RFLP loci associated with soybean seed protein and oil content across populations and locations. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 649-657, 1996.

LIEW, M. et al. Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by High-Resolution Melting of Small Amplicons. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1156-1164, 2004.

LIMA, A. A. et al. In silico characterization of putative members of the coffee (*Coffea arabica*) ethylene signaling pathway. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 2, p. 1277-1289, 2011.

LITT, M.; LUTY, L. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, n. 3, p. 398-401, 1989.

LIU, P. et al. Mapping QTLs for oil traits and eQTLs for oleosin genes in jatropha. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 132, 2011.

LOPES, V. R. **Divergência genética entre clones de cana-de-acucar da série RB97**. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MAHMOOD, T. et al. Identification of quantitative trait loci (QTL) for oil and protein contents and their relationships with other seed quality traits in *Brassica juncea*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, p. 1211-1220, 2006.

MEHRZAD, E.; ELROY, R. C.; ISTVAN, R. Genetic control of soybean seed oil: I. QTL and genes associated with seed oil concentration in RIL populations derived from crossing moderately high-oil parents. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, p. 483-495, 2013.

MENDOZA, M. S. et al. Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 54, p. 608-620, 2008.

MENDOZA, M. S. et al. LEAFY COTYLEDON 2 activation is sufficient to trigger the accumulation of oil and seed specific mRNAs in *Arabidopsis* leaves. **FEBS Letters**, v. 579, p. 4666-4670, 2005.

MIHALIK, S. J et al. Participation of Two Members of the Very Long-chain Acyl-CoA Synthetase Family in Bile Acid Synthesis and Recycling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 27, p. 24771-24779, 2002.

MORRISH, F. et al. Myc-dependent Mitochondrial Generation of Acetyl-CoA Contributes to Fatty Acid Biosynthesis and Histone Acetylation during Cell Cycle Entry. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 47, p. 36267-36274, 2010.

MULLIS K. et al. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology**, v. 1, p. 263-373, 1986.

NGO, M. H.; COLBOURNE, T. R.; RIDGWAY, N. D. Functional implications of sterol transport by the oxysterol-binding protein gene family. **Biochemical Journal**, v. 429, p. 13-24, 2010.

NICHOLS, D. M. et al. Fine mapping of a seed protein QTL on soybean linkage group I and its correlated effects on agronomic traits. **Crop Science**, v. 46, p. 834-839, 2006.

OSWALD, O.; BAUER, J.; ZANK, T. Nucleic acid encoding lipid metabolizing protein from sunflower that cause elevation of fatty acid levels. **United States Patent n.11/021,619**. (Publication n. 7,238,856 B2), 2007

PAIVA, B. M.; ALVES, R. M.; HELENO, N. M.. Aspectos socioeconômicos da soja. In: Soja na alimentação humana. Informe Agropecuário, Belo Horizonte: EPAMIG, v. 27, n. 230, p. 7-14, fev. 2006.

PANTHEE, D. R. et al. Quantitative Trait Loci for Seed Protein and Oil Concentration, and Seed Size in Soybean. **Crop Science**, v. 45, p. 2015-2022, 2005.

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical Applied Genetic**, v.85, p.985-993, 1993.

PHYTOZOME WORKSHOP. Joint Genome Institute's Plant Genomics portal. JGI Users Meeting, March, 2010.

Qi, Z. et al. Soybean oil content QTL mapping and integrating with meta-analysis method for mining genes. **Euphytica**, v. 179, p. 499-514, 2011.

RAFALSKI, A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 5, n. 2, p. 94-100, 2002.

REED, G. H.; KENT, J. O.; Wittwer, C. T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, v. 8, n. 6, p. 597-608, 2007.

REED, G. H.; WITTEWER, C. T. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. **Clinical Chemistry**, v. 50, p. 1748-1754, 2004.

ROCHA, R. B. et al. O mapeamento genético no melhoramento de plantas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, 2003.

RODRIGUES, J. I. S. et al. Mapeamento de QTL para conteúdos de proteína e óleo em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 5, p. 472-480, 2010.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 74; p. 5463-5467, 1977.

SHI, L. et al. Arabidopsis glabra2 mutant seeds deficient in mucilage biosynthesis produce more oil. **The Plant Journal**, v. 69, n. 1, p. 37-46, 2011.

SHOEMAKER, R. C. et al. Microsatellite discovery from BAC end sequences and genetic mapping to anchor the soybean physical and genetic maps. **Genome**, v. 51, p. 294-302, 2008.

SHU, Y. et al. SNPs discovery and CAPS marker conversion in soybean. **Molecular Biology Report**, v. 38, p. 1841-1846, 2011.

SILVA, A. C.; LIMA, E. P. C.; BATISTA, H. R. A importância da soja para o agronegócio brasileiro: uma análise sob o enfoque da produção, emprego e exportação. Área temática: 8. **Economia rural e agricultura familiar**, 2010.

SMITH, B. L.; LU, C. P.; J. R.; BREMER, A. High-resolution melting analysis (HRMA): a highly sensitive inexpensive genotyping alternative for population studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 1, p. 193, 2009.

SOBIN, K.; ASHISH, M. SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 9, p. 289-320, 2007.

SOYBASE. Integrating Genetics and Molecular Biology for Soybean Researchers. Disponível em: <<http://www.soybase.org/>> Acesso em: 12 out. 2012.

SOYSTATS - AMERICAN SOYBEAN ASSOCIATION. Disponível em 2011: <<http://www.soystats.com/2012/Default-frames.htm>> Acesso em: 05 mar. 2012.

USDA - SOYBEAN AREA, YIELD AND PRODUCTION. In: World agricultural production. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov>>. Acesso em: 14 abr. 2012.

VANDERSTEEN, J. G. et al. Identifying Common Genetic Variants by High-Resolution Melting. **Clinical Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 1191-1198, 2007.

VARSHNEY, R. K. et al. Development of cost-effective SNP assays for chickpea genome analysis and breeding. **An Open Access Journal**, v. 3, n. 1, 2007.

- VILLELA, P. M. S. et al. High resolution melting na identificação de espécies de Crocodilianos Brasileiros. Resumos do 56º Congresso Brasileiro de Genética, p. 56, 2010.
- WANG, D. G.; FAN, J. B.; SIAO, C. J.; BERNO, A.; YOUNG, P. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome. **Science**, v. 280, p. 1077-1082, 1998.
- WANG, H. et al. Dissection of two soybean QTL conferring partial resistance to *Phytophthora sojae* through sequence and gene expression analysis. **BMC Genomics**, v. 13, n. 428, p. 1471-2164, 2012.
- WANG, H. W. et al. The soybean Dof-type transcription factor genes, GmDof4 and GmDof11, enhance lipid content in the seeds of transgenic *Arabidopsis* plants. **The Plant Journal**, v. 52, p. 716-729, 2007.
- WARDLAW, G. M.; SNOOK, J. T. Effect of diet high in butter, corn oil, or high-oleic acid sunflower oil on serum lipids and apolipoproteins in men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, p. 815-821, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research.**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WITTEWER, C. T. et al. High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 853-860, 2003.
- WRAY, G. A. The evolutionary significance of cis-regulatory mutation. **Nature Reviews Genetics**. v. 8, n. 3, p. 206, mar. 2007.
- WÜRSCHUM, T. et al. Dissecting the genetic architecture of agronomic traits in multiple segregating populations in rapeseed (*Brassica napus* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 124, p. 153-161, 2012.
- XUEYI, H. et al. Mapping of the loci controlling oleic and linolenic acid contents and development of fad2 and fad3 allele-specific markers in canola (*Brassica napus* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, p. 497-507, 2006.
- ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprint. **European Patent Application n. 92402629.7**. (Publication n. 0534858 A1), 1993.
- ZHANG, W. K. et al. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 1131-1139, 2004.
- ZIETKIEWICZ, E.; RFALSKIM, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**. Canada, v. 20, p. 176-183, 1994.

## ANEXO 1

Análise Genotípica e Fenotípica da população de RILs do gene GDSL15-31. Na genotipagem, 0 corresponde ao alelo homocigoto com a base nitrogenada T, 1 alelo heterocigoto com a base nitrogenada T/G e 2 alelo homocigoto com a base nitrogenada G. Os valores em porcentagem correspondem a Fenotipagem.

<b>Número indivíduos</b>	<b>Nome amostras</b>	<b>Gene GDSL15-31</b>	<b>Teor de Óleo (%)</b>	<b>Teor de Proteína (%)</b>
1	2	0	22.17	35.59
2	3	0	23.41	38.31
3	4	0	23.67	34.13
4	5	0	23.23	35.17
5	6	0	23.14	36.16
6	7	2	23.00	35.37
7	8	1	22.46	37.38
8	9	0	19.86	39.88
9	10	0	22.72	37.11
10	11	0	24.52	34.17
11	12	0	21.30	37.00
12	13	2	23.63	36.78
13	14	2	21.96	38.27
14	15	2	21.70	35.94
15	16	0	22.65	35.72
16	17	0	23.47	35.45
17	18	2	21.34	37.39
18	19	0	22.15	37.52
19	21	2	22.88	36.50
20	22	0	23.80	35.90
21	23	2	22.43	36.94
22	24	2	22.57	36.81
23	25	0	23.24	36.07
24	27	2	22.90	37.37
25	28	2	22.11	36.47
26	29	1	22.95	37.08
27	30	2	21.04	37.64
28	31	0	22.88	37.45
29	32	0	25.31	34.03
30	33	2	23.08	35.79
31	35	0	23.31	34.64
32	36	2	22.44	36.50
33	37	2	22.32	35.42
34	38	0	23.16	34.87
35	39	2	22.85	34.58
36	40	1	20.98	38.39
37	41	2	21.70	37.18
38	42	0	23.19	34.78
39	43	0	22.65	36.78
40	45	2	22.02	37.92
41	46	0	21.62	37.90
42	47	1	21.56	36.37
43	48	2	22.49	36.12
44	49	2	21.72	36.06
45	50	0	20.70	38.83
46	51	2	22.94	36.50
47	52	2	21.54	36.07
48	53	0	21.42	34.16
49	54	2	22.20	36.77
50	55	2	21.22	36.14
51	56	0	23.74	33.94

---

52	57	0	22.36	37.79
53	58	0	22.94	36.55
54	59	0	22.75	38.05
55	60	2	22.18	35.96
56	61	0	23.07	36.01
57	62	2	21.86	37.78
58	63	0	22.20	37.43
59	65	0	22.15	37.52
60	66	2	20.50	39.75
61	67	2	23.51	35.87
62	68	2	22.92	37.49
63	69	0	22.86	35.74
64	70	2	23.61	35.27
65	71	0	21.42	39.40
66	72	2	22.99	35.98
67	73	2	22.82	36.41
68	74	0	24.19	34.17
69	75	2	23.98	33.22
70	76	2	21.25	37.05
71	77	2	23.95	34.99
72	79	2	22.44	37.06
73	80	2	23.11	36.12
74	81	1	23.37	36.61
75	82	1	22.39	35.41
76	83	0	22.95	36.22
77	84	2	21.87	36.80
78	85	0	23.97	34.23
79	86	2	22.90	34.52
80	87	0	22.91	34.96
81	88	0	20.76	38.67
82	90	0	22.51	37.95
83	91	2	23.10	35.93
84	92	0	23.61	37.18
85	93	0	23.09	36.14
86	94	2	23.24	34.69
87	95	0	22.08	36.71
88	96	2	20.61	36.24
89	97	0	21.75	36.82
90	98	2	22.64	34.50
91	99	2	23.26	35.39
92	100	0	22.84	35.94
93	101	2	21.05	39.08
94	102	2	22.41	37.66
95	103	0	23.46	34.64
96	105	2	22.12	36.38
97	106	2	22.85	34.36
98	108	0	24.10	35.18
99	109	0	22.25	35.44
100	110	0	23.38	36.18
101	111	0	23.27	35.96
102	112	0	23.67	34.73
103	113	2	23.55	34.11
104	114	0	23.44	35.92
105	115	0	21.75	38.70
106	116	2	22.84	36.52
107	117	2	23.31	35.99
108	118	0	22.10	36.56
109	119	0	22.15	34.84
110	120	0	22.28	35.32
111	121	2	20.93	36.51

---

---

112	122	0	21.20	36.37
113	123	0	23.25	36.03
114	125	0	23.31	36.01
115	126	2	22.08	36.48
116	127	2	22.83	35.56
117	128	2	23.46	34.75
118	129	2	24.18	35.27
119	130	0	22.87	35.76
120	131	0	21.72	36.94
121	132	2	22.40	35.82
122	133	2	23.12	36.08
123	134	2	20.72	36.43
124	135	2	23.24	36.15
125	136	0	21.15	37.76
126	137	0	22.29	35.31
127	139	0	22.10	36.53
128	140	0	21.75	35.86
129	141	2	22.26	36.59
130	142	0	21.58	35.77
131	143	2	24.04	34.59
132	144	2	22.42	36.41
133	147	2	22.16	35.21
134	148	2	23.47	36.36
135	149	2	22.97	35.50
136	150	2	22.99	37.79
137	151	2	22.67	38.03
138	152	2	23.12	36.76
139	153	0	21.04	37.14
140	154	2	22.20	36.76
141	155	0	21.77	35.95
142	156	0	22.80	36.23
143	157	2	23.35	35.09
144	158	2	22.35	36.69
145	159	0	24.58	35.55
146	160	2	22.44	34.25
147	161	1	22.17	37.82
148	162	0	23.54	34.70
149	163	0	22.58	36.06
150	164	0	21.80	35.70
151	165	0	22.63	36.16
152	166	0	21.88	36.98
153	167	0	22.98	36.55
154	168	2	21.79	36.91
155	170	0	22.12	37.78
156	171	2	23.25	35.65
157	172	0	22.66	36.19
158	173	0	22.82	36.25
159	174	2	23.40	35.06
160	175	2	22.39	34.75
161	176	0	22.41	35.89
162	177	2	23.47	36.43
163	178	0	22.89	36.57
164	179	2	23.72	34.58
165	180	2	23.16	35.63
166	181	0	22.68	33.41
167	182	2	23.22	36.59
168	183	2	23.11	34.15
169	185	0	23.31	35.61
170	186	2	22.58	36.30
171	187	2	22.42	36.54

---

---

172	188	0	21.07	36.63
173	189	2	23.97	34.38
174	190	2	23.02	35.14
175	191	0	22.55	35.51
176	192	2	22.89	33.74
177	193	2	22.89	36.36
178	194	2	22.46	35.47
179	195	2	22.05	37.56
180	197	2	23.10	35.10
181	199	0	22.55	35.34
182	200	2	22.46	34.59
183	201	0	22.78	34.29
184	206	2	22.36	36.37
185	207	2	22.86	35.62
186	208	0	22.36	36.22
187	211	0	22.50	35.03
188	212	2	22.81	36.65
189	213	0	23.17	38.12
190	214	2	23.95	34.69
191	215	0	20.87	36.33
192	216	1	22.60	34.94
193	217	2	22.68	35.47
194	218	0	22.55	35.59
195	219	2	23.74	35.07
196	220	2	22.97	34.48
197	221	0	23.25	35.93
198	222	0	23.01	34.48
199	223	0	22.96	36.53
200	224	2	20.56	40.12
201	225	1	22.52	35.34
202	227	0	22.71	31.82
203	228	0	24.23	32.16
204	229	2	21.17	36.82
205	230	2	22.74	34.88
206	232	0	23.02	35.99
207	233	2	23.15	34.88
208	235	0	21.34	38.28
209	236	0	21.96	36.30
210	237	0	22.77	34.88
211	238	2	22.27	35.68
212	239	1	21.13	36.82
213	240	1	21.63	37.02
214	241	0	22.29	37.43
215	242	2	20.47	38.16
216	243	0	23.13	35.58
217	244	0	23.24	35.62
218	245	0	22.58	35.50
219	246	1	22.84	35.23
220	247	0	22.97	34.78
221	249	2	21.39	36.16
222	250	0	22.36	34.83
223	253	2	21.83	35.62
224	254	0	22.17	34.17
225	255	2	21.33	37.89
226	256	0	22.47	37.42
227	257	1	23.76	34.76
228	258	0	23.00	37.20
229	259	2	22.19	36.73
230	260	2	23.20	35.29
231	261	2	23.05	35.04

---

---

232	262	0	22.78	35.74
233	CD01RR8384	0	22.63	35.46
234	SUPREMA	2	22.45	35.07

---