

DARIO ALVES DE OLIVEIRA

**MAPEAMENTO DE QTLs PARA CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E
RELAÇÃO ENTRE LIPOXIGENASES E TEOR DE ÁCIDO LINOLÊNICO
COM A QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE SOJA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2002

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

T	Oliveira, Dario Alves de, 1966-
O48m 2002	Mapeamento de QTLs para características agronômicas e relação entre lipoxigenases e teor de ácido linolênico com a qualidade fisiológica de sementes de soja / Dario Alves de Oliveira. – Viçosa : UFV, 2002. 100p. : il.
	Orientador: Maurílio Alves Moreira Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa
	1. Soja - Análise de QTLs. 2. Soja - Semente - Qualidade fisiológica. 3. Soja - Semente - Lipoxigenases. 4. Soja - Semente - Teor de ácido linolênico. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.
	CDD 19.ed. 633.3421 CDD 20.ed. 633.3421

DARIO ALVES DE OLIVEIRA

**MAPEAMENTO DE QTLs PARA CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E
RELAÇÃO ENTRE LIPOXIGENASES E TEOR DE ÁCIDO LINOLÊNICO
COM A QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE SOJA**

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

APROVADA: 21 de janeiro de 2002.



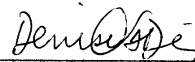
Pesquisador Dr. Ivan Schuster



Prof. Múcio Silva Reis



Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Conselheiro)



Prof^a Denise Cunha F.S. Dias
(Conselheira)



Prof. Maurílio Alves Moreira
(Orientador)

A Deus.

Aos meus pais Raul e Enedina.

Aos meus irmãos Amantino, Élcio e Paulo.

À minha esposa Clarice.

À minha filha Júlia.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo.

À Universidade Federal de Viçosa, pela minha formação pessoal, profissional e pela oportunidade de realização do Curso.

À COODETEC, pela condução e avaliação do experimento de Cascavel, no Estado do Paraná.

Ao professor Maurílio Alves Moreira, pela coerência e atenção na orientação durante o Curso.

Aos professores conselheiros, Everaldo Gonçalves de Barros, Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias, Carlos Sigueyuki Sedyama, pela colaboração neste trabalho.

Aos amigos Newton Deniz Piovesan, Ivan Schuster, Inês Chamel e Rita Maria Alves de Moraes, pela grande colaboração nas análises bioquímicas e análises estatísticas.

Ao Paulinho, pela força nas análises realizadas no laboratório de sementes de soja e no campo da agronomia.

Aos amigos Newton, Luis Adriano, Carlos, Geraldo e Francisco, pela alegre convivência.

A todos os colegas do BIOAGRO.

Ao Paulo Afonso da Silva, da Copiadora Coopasul, pela excelente formatação de minha tese.

Aos meus pais, pelo grande e insistente esforço em educar os filhos.

Aos meus irmãos, pelo apoio constante.

Aos meus tios Itamar e Carminha, pelo exemplo de luta e contribuição pela educação.

Aos meus tios Darci (*in memoriam*) e Helena, pelo apoio de sempre.

À minha esposa Clarice, pela ajuda e compreensão das longas horas de trabalho.

À minha filha Júlia, pelo seu encanto e pelo seu amor.

E a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

DARIO ALVES DE OLIVEIRA, filho de Raul Alves de Oliveira e Enedina de Oliveira Alves, nasceu em 4 de maio de 1966, em Piraúba, Minas Gerais.

Cursou o primário na Escola Estadual “D. Maria Duarte Braga” e o curso ginásial na Escola Estadual “Pro^{fa} Francisca Pereira Rodrigues”, em Piraúba, Minas Gerais.

Em dezembro de 1983, concluiu o curso de Técnico em Agropecuária na Escola Agrotécnica Federal de Rio Pomba, na cidade de Rio Pomba, Minas Gerais.

Em março de 1990, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 1996, defendeu tese de Mestrado em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa.

Em janeiro de 2002, apresentou defesa de tese de Doutorado em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO 1	1
MAPEAMENTO DE QTLs ASSOCIADOS A CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS EM SOJA	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Base genética da soja	4
2.2. Herdabilidade.....	5
2.3. Marcadores moleculares	5
2.4. Mapeamento genético	7
2.4.1. Mapeamento de caracteres de herança quantitativa	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Material genético	13
3.2. Análise das características agronômicas	14
3.3. Análise de variância.....	14
3.3.1. Análise de variância individual	14
3.3.2. Análise de variância conjunta	16

	Página
3.4. Extração de DNA	21
3.5. Amplificação de DNA e eletroforese	22
3.6. Identificação e mapeamento de QTL's	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Polimorfismos e seleção dos “primers” de microsatélites	26
4.2. Mapa de ligação genética	29
4.3. Análise das características agronômicas	29
4.4. Mapeamento de QTL's	38
5. RESUMO E CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
CAPÍTULO 2.....	64
LIPOXIGENASES, TEOR DE ÁCIDO LINOLÊNICO E QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE SOJA	64
1. INTRODUÇÃO.....	64
2. REVISÃO DE LITERATURA	66
2.1. Qualidade fisiológica das sementes	66
2.1.1. Germinação e vigor	67
2.2. Peroxidação de lipídios	68
3. MATERIAL E MÉTODOS	73
3.1. Material genético e procedimentos utilizados.....	73
3.2. Detecção de lipoxigenases 1 e 3 por meio de método colorimétrico.....	74
3.3. Determinação da atividade de LOX 1 e LOX 3	75
3.4. Teste de germinação	76
3.5. Teste de envelhecimento acelerado	76
3.6. Determinação do índice de velocidade de emergência	77
3.7. Determinação de aldeídos totais	77
3.8. Determinação de ácidos graxos	78
3.9. Determinação dos teores de lipídios.....	79
3.10. Análise estatística	79
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
4.1. Germinação	80
4.2. Envelhecimento acelerado	82
4.3. Índice de velocidade de emergência	86
4.4. Teores ácido linolênico, lipídios e de aldeídos totais	87

	Página
5. RESUMO E CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
APÊNDICE	97

RESUMO

OLIVEIRA, Dario Alves de, D.S., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2002. **Mapeamento de QTLs para características agronômicas e relação entre lipoxigenases e teor de ácido linolênico com a qualidade fisiológica de sementes de soja.** Orientador: Maurílio Alves Moreira. Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros, Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias e Carlos Sigueyuki Sedyama.

Foram conduzidos dois experimentos: 1) mapeamento de QTLs para características agronômicas em soja; 2) lipoxigenases, teor de ácido linolênico e qualidade fisiológica de sementes de soja. O mapeamento de QTLs é uma das primeiras etapas para a implantação da seleção assistida por marcadores moleculares nos programas de melhoramento de plantas. Além de identificar marcadores moleculares associados a QTLs que controlam características de interesse, o mapeamento permite entender as relações existentes entre as diferentes características. O primeiro experimento teve o objetivo de identificar marcadores do tipo microssatélites ligados a QTL's que controlam as características dias para maturação, altura de planta na maturação, número de nós na maturação, número de vagens por planta, altura da primeira vagem, altura de inserção da primeira vagem, número de sementes por planta, peso de sementes por planta, peso de cem sementes e teor de proteína. Foram utilizados 118 RIL's (linhagens recombinantes endogâmicas), que se encontravam nas gerações F₆ e F₇.

Inicialmente foi realizado um cruzamento entre os genótipos BARC-8 e Garimpo, contrastantes para as características agronômicas avaliadas. As RIL's foram obtidas pela descendência, a partir da geração F₂, de uma única semente de cada planta, SSD ("single seed descent"). As RIL's foram cultivadas em quatro ambientes: Viçosa-MG, 1999; Cascavel-PR, 1999; Viçosa-MG, 2000 e São Gotardo-MG, 2000. O mapeamento genético foi realizado com marcadores microssatélites. Com a utilização de um nível de significância de 10% para o mapa foram identificados os seguintes QTLs: 1) dois QTLs ambientes não específicos nos grupos de ligação C1 e E e dois QTLs ambiente específicos nos grupos de ligação N e G associados à característica teor de proteína; 2) dois QTLs ambientes específicos nos grupos de ligação D2 e J associados à característica altura de inserção da primeira vagem; 3) um QTL ambiente não específico nos grupos de ligação K e dois QTLs ambientes específicos nos grupos de ligação D2 e J, associados à característica dias para maturação; 4) dois QTLs ambientes específicos nos grupos de ligação F e J associados à característica número de vagens por planta; 5) três QTLs ambientes específicos nos grupos de ligação F, C1 e K associados à característica número de sementes por planta; 6) três QTLs ambientes específicos nos grupos de ligação D2, K e D1b+W associados à característica número de nós na maturação; 7) um QTL ambiente específico no grupo de ligação C1 e dois QTLs ambientes não específicos nos grupos de ligação K e G associados à característica peso de cem sementes; 8) um QTL ambiente não específico nos grupo de ligação D2 e um QTL ambiente específico nos grupo de ligação J, associados à característica altura da primeira vagem; e 9) dois QTLs ambientes não específicos nos grupo de ligação D2 e J e um QTL ambiente específico no grupo de ligação G, associados à característica altura de plantas na maturação. Lipoxigenases (E.C. 1.13.11.12) são enzimas que catalisam a adição de oxigênio molecular a ácidos graxos polinsaturados. As lipoxigenases (LOX) estão presentes nas sementes de soja na forma de três isoenzimas LOX1, 2 e 3. Os ácidos linoléico e linolênico destacam-se como os mais susceptíveis à degradação oxidativa enzimática e não enzimática. A hidroperoxidação dos ácidos graxos polinsaturados pela ação de lipoxigenases leva a produção do 9 e do 13 hidroperóxidos do ácido graxo,

que por reações subseqüentes produzem aldeídos e cetonas de cadeia curta. Estes compostos secundários produzidos têm sido associados com a deterioração de sementes. No segundo experimento o objetivo foi determinar a influência das isoenzimas lipoxigenases e do teor de ácido linolênico na qualidade de sementes de soja. Inicialmente foi realizado um cruzamento entre os genótipos BARC-12 e Doko-TN. O genótipo BARC-12 tem baixo teor de ácido linolênico e a presença das isoenzimas LOX 1, 2 e 3. O genótipo Doko-TN é uma linhagem avançada do Programa de Melhoramento de Soja do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) que possui teor normal de ácido linolênico e ausência de lipoxigenases (linhagem triplo-nula). Na geração F5, as sementes foram colhidas com retardamento de colheita no campo, nos estádios R8, R8+10, R8+20 e R8+30 dias. Em seguida, foram construídos “bulks” de sementes com as seguintes características: (1) presença de lipoxigenases e teor normal de ácido linolênico; (2) presença de lipoxigenases e baixo teor de ácido linolênico; (3) ausência de lipoxigenases e teor normal de ácido linolênico e (4) ausência de lipoxigenases e baixo teor de ácido linolênico. A qualidade das sementes dos “bulks” foi avaliada por meio dos testes de germinação, envelhecimento acelerado, velocidade de emergência das plântulas em substrato de areia e porcentagem de emergência aos cinco dias em substrato de areia. Sementes com baixo teor de ácido linolênico apresentaram no teste de envelhecimento acelerado maior porcentagem de germinação e menor número de plântulas anormais quando colhidas após o estágio R8+20 dias. Sementes com presença de lipoxigenases apresentaram maior índice de velocidade e porcentagem de plântulas emergidas em areia no quinto dia após a implantação do teste de velocidade de emergência. Os resultados indicaram que a característica baixo teor de ácido linolênico conferiu maior vigor às sementes de soja e a presença de lipoxigenases conferiu maior velocidade de emergência de plântulas.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Dario Alves de, D.S., Universidade Federal de Viçosa, January 2002. **Mapping of QTLs for agronomic traits and relationship among lipoxygenases and linolenic acid content with physiological quality of soybean seeds.** Adviser: Maurílio Alves Moreira. Committee Members: Everaldo Gonçalves de Barros, Denise Cunha Fernandes dos Santos dias and Carlos Sigueyuki Sedyama.

In this work two experiments were carried out: I - Mapping QTLs for soybean agronomic traits and II – Effects of genetic elimination of lipoxygenases and reduced linolenic acid content on physiological quality of soybean seeds. Mapping Quantitative Trait Loci (QTLs) is one of the first steps for the implementation of molecular markers assisted selection in plant breeding. Besides the identification of molecular markers associated to QTLs that control the trait of interest, mapping allows to understand the relationship among different traits. In the first experiment, QTLs were mapped in recombinant inbred lines (RILs) from a cross between two soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars: Garimpo and BARC-8. RILs were obtained by single seed descent (SSD). 118 F6 and F7 RILs were grown at four locations: Viçosa-MG 1999, Cascavel-PR 1999, Viçosa-MG 2000 and São Gotardo-MG 2000. The traits analyzed included plant height, first pod height, number of seeds per plant, maturity, plant seed weight, one hundred seed weight, seed protein content, number of knots, number of pods and

insertion of first pod height. The map was constructed with microsatellites markers. The following QTLs were identified: (1) Two QTLs non-environment specific in linkage groups C1 and E and two QTLs environment specific in linkage groups N and G associate with seed protein content; (2) two QTLs environment specific in linkage groups D2 and J associated with first pod insertion height; (3) one QTL non-environment specific in linkage group K and two QTLs environment specific in linkage groups F and J associated with maturity; (4) two QTLs environment specific in linkage groups F and J associated with number of pods per plant; (5) three QTLs environment specific in linkage groups F, C1 and K associated with number of seeds per plant; (6) three QTLs environment specific in linkage groups D2, K and D1b+W associated with number of knots; (7) one QTL environment specific in linkage group C1 and two QTLs non-environment specific in linkage groups K and G associated with one hundred seed weight; (8) one QTL non-environment specific in linkage group D2 and one QTL environment specific in linkage group J associated with first pod height; (9) two QTLs non-environment specific in linkage groups D2 and J and one QTL environment specific in linkage group G associated with plant height. In the second experiment, we determine effects of absence of lipoxygenases and low linolenic acid content on seed quality after delayed harvest. Seeds from a cross between the genotypes, BARC-12 (low linolenic acid content) and Doko TN (lipoxygenases absent) were grown under green house and field conditions. F5 seeds were harvested at the stage R8 and 10, 20 and 30 days after R8 stage. Four different bulks were constructed: (1) seeds with lipoxygenase and normal linolenic acid content; (2) seeds with lipoxygenase and low linolenic acid content; (3) seeds without lipoxygenase and normal linolenic acid content and (4) seeds without lipoxygenase and low linolenic acid content. Seed physiological quality was evaluated by the standard germination test, accelerated aging test and emergence speed index. Seeds with low linolenic acid content presented higher seed quality as measured by accelerated aging test. Seeds with lipoxygenase showed higher vigor as compared to those lacking these isozymes as determined by emergence speed index.

CAPÍTULO 1

MAPEAMENTO DE QTL's ASSOCIADOS A CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS EM SOJA

1. INTRODUÇÃO

A seleção de características agronômicas monitoradas por marcadores moleculares baseia-se no princípio de que um gene, ou um grupo de genes, encontra-se ligado a um marcador genético de fácil identificação. Dessa forma, esses marcadores poderão ser usados para selecionar as características de interesse em um programa de melhoramento. O método mais eficaz para determinar esse tipo de associação envolve a construção de mapas genéticos detalhados, nos quais podem ser localizadas regiões contendo locos para características quantitativas (QTLs).

O mapeamento de QTLs é uma das primeiras etapas para a implantação da seleção assistida por marcadores moleculares nos programas de melhoramento de plantas. Além de identificar marcadores moleculares associados a QTLs que controlam características de interesse, o mapeamento permite entender as relações existentes entre as diferentes características.

O primeiro mapa genético para soja foi construído com um número de grupos de ligação bem próximo ao de cromossomos, no qual foram definidos 21 grupos contendo 81 marcadores RFLP e 13 marcadores RAPD (WILLIAMS et al., 1990). SHOEMAKER (1994) desenvolveram um mapa com 24 grupos de ligação contendo 359 marcadores RFLP, no qual foram mapeadas nove regiões ligadas a características quantitativas e dez ligadas a caracteres qualitativos. KEIM et al. (1997) construíram um mapa saturado de soja numa população de 300 linhagens endogâmicas recombinantes do cruzamento entre as variedades BSR-101 X PI437.654. Primeiramente foi construído um mapa-base com 165 marcadores RFLP, utilizando-se toda a população de 300 indivíduos. Quarenta e dois indivíduos foram empregados para a inclusão de 650 marcadores AFLP. O mapa final, apresenta 840 marcadores, sendo 165 RFLP, 650 AFLP e 25 RAPD, abrangendo 3.441 cM em 28 grupos de ligação. CREGAN et al. (1999) construíram um mapa integrado para a soja utilizando dados de três mapas diferentes: USDA/Iowa State (*G. max* x *G. soja*), Univ. de Utah (Minsoy x Noir), e da Univ. de Nebraska (Clark x Harosoy). Este mapa integrado foi definido utilizando um total de 606 primers SSR e outros marcadores (RFLP, RAPD, AFLP, isoenzimas e marcadores fenotípicos) totalizando 1.423 marcadores. Foram definidos 20 grupos de ligação consenso.

ORF et al. (1999) trabalharam com marcadores moleculares microssatélites e marcadores RFLP. Foram avaliadas características agronômicas em três populações RIL's provenientes dos cruzamentos entre os cultivares Minsoy e Noir, Minsoy e Archer e Noir e Archer. As características avaliadas foram: altura de plantas, enchimento de grãos, dias para florescimento, dias para o período reprodutivo, dias para maturação, produção, teor de óleo e proteína e comprimento de folhas. Foram utilizados marcadores RFLP e microssatélites. Foram identificados QTLs para todas as características avaliadas, com utilização de $LOD \geq 3$ em 17 dos 20 grupos de ligação presentes. Os resultados obtidos mostraram que a utilização desta metodologia é uma boa ferramenta para obtenção de mapas relacionados a características agronômicas. LEE et al. (1996), por meio de utilização de metodologia RFLP, identificaram locos associados com altura de plantas e enchimento de grãos no grupo de ligação L.

As características agronômicas avaliadas são componentes importantes relacionadas à cultura da soja. Estas características estão relacionadas a fatores como ciclo da cultura, resistência ao acamamento, colheita mecanizada e produtividade. O mapeamento de QTLs vai permitir a seleção destas características assistida por marcadores moleculares em programas de melhoramento de soja.

A proposta deste trabalho foi identificar QTLs para as seguintes características agronômicas em soja: dias para maturação, altura de planta na maturação, número de nós na maturação, número de vagens por planta, altura da primeira vagem, altura da inserção da primeira vagem, número de sementes por planta, peso de sementes por planta, peso de 100 sementes e teor de proteína.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Base genética da soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa originária da China, autógama, alotetraplóide, com 20 pares de cromossomos (SHOEMAKER et al., 1992). Sua base genética é bastante restrita, provavelmente por ser uma espécie autógama, com indivíduos altamente homozigotos e a maioria dos cultivares apresentarem ancestrais comuns (KEIM et al., 1989).

A diversidade genética em soja tem sido estudada com a aplicação de diferentes informações, tais como características morfológicas, coeficiente de parentesco, isoenzimas e marcadores moleculares do tipo RFLP, RAPD, AFLP e microssatélites. Nos Estados Unidos, a base genética das variedades recomendadas é derivada de cerca de 15 progenitores (GIZLICE et al., 1993; MAUGHAN et al., 1996). A avaliação da diversidade genética em 38 cultivares brasileiros de soja por meio do uso de marcadores moleculares confirma também uma baixa diversidade genética do germoplasma de soja brasileiro (ABDELNOOR et al., 1995).

2.2. Herdabilidade

Herdabilidade é a fração da variância fenotípica de uma unidade a ser transmitida para a progênie, ou em termos de unidade de seleção, a fração do diferencial de seleção esperado pelo ganho, quando a seleção é praticada em uma referida unidade. A estimativa do coeficiente de herdabilidade atende a duas finalidades básicas no melhoramento genético: demonstrar a relativa facilidade com que diferentes caracteres são selecionados em um determinado esquema de melhoramento, e a de permitir que estimativas dos progressos esperados com a seleção sejam obtidas (HANSON, 1963).

A herdabilidade de um caráter métrico é uma das mais importantes propriedades de uma população, porque expressa a proporção da variância total que é atribuída ao efeito médio dos genes, o que determina o grau de semelhança entre progenitores (FALCONER, 1987).

JOHNSON e BERNARD (1963) estudaram a herdabilidade para várias características em soja. Os autores concluíram que em gerações precoces (F_2), a herdabilidade apresenta baixos valores, quando comparadas com gerações mais avançadas (F_4).

2.3. Marcadores moleculares

Marcadores genéticos podem ser utilizados na construção de mapas de ligação de alta densidade. Técnicas como RFLP, RAPD, AFLP e microssatélites, que se baseiam na variação natural da seqüência de bases do DNA, são alguns exemplos que podem ser utilizados na construção destes mapas.

Os marcadores RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphisms") foram os primeiros marcadores de DNA a serem utilizados na construção de mapas genéticos na espécie humana (BOTSTEIN et al., 1980). Posteriormente, os RFLPs foram amplamente empregados nas mais variadas áreas da genética animal e vegetal. A técnica do RFLP é baseada na digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, que cortam o DNA em regiões específicas do genoma, separação dos fragmentos em gel de

agarose e transferência destes para membranas de nitrocelulose, onde são hibridizados com sondas de DNA marcadas. O polimorfismo é obtido quando ocorre mutação de ponto, perda ou surgimento de sítios de restrição e quando ocorrem inserções ou deleções entre os dois sítios de restrição que flanqueiam uma região homóloga à sonda de DNA. Os marcadores RFLP apresentam herança co-dominante, sendo possível a identificação de indivíduos homozigotos e heterozigotos na população.

Os marcadores RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) são fragmentos discretos de DNA, amplificados pela reação da polimerização em cadeia a partir de *primers* únicos de seqüência arbitrária com conteúdo de CG maior que 50%, que se ligam ao DNA genômico em dois sítios, em fitas opostas do DNA molde. Se estes sítios estiverem separados por uma distância amplificável (geralmente 200 a 2000 pb), produtos de amplificação são formados. O número e o tamanho dos fragmentos amplificados depende da seqüência do *primer* usado e da seqüência de bases do DNA molde (TINGEY e DEL TUFO, 1993). Os polimorfismos resultam de mudanças na molécula de DNA que alteram os sítios de ligação dos *primers*, diminuindo ou aumentando a distância entre eles. Essas mudanças podem alterar o comprimento do fragmento compreendido entre os dois sítios ou mesmo impedir que a amplificação ocorra. Os marcadores RAPD se baseiam na reação de PCR (“Polymerase Chain Reaction”). O uso deste tipo de marcadores é muito prático, permite automação e não há necessidade do conhecimento prévio da seqüência de DNA. Este tipo de marcador não permite a distinção entre indivíduos heterozigotos e homozigotos, sendo portanto, considerado dominante.

Os marcadores AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) aliam a especificidade dos sítios de restrição do RFLP com a praticidade da amplificação do PCR (VOS et al., 1995). A técnica baseia-se na digestão simultânea do DNA genômico com duas enzimas de restrição, sendo *Eco* RI e *Mse* I as mais usadas. Adaptadores específicos com terminais complementares às extremidades coesivas dos sítios de restrição são ligados aos fragmentos de DNA digeridos, sendo utilizado um adaptador específico para cada sítio de restrição. Estes fragmentos são submetidos à uma reação de PCR com *primers* pré-seletivos de seqüência complementar

aos adaptadores, acrescidos de um nucleotídeo arbitrário na sua extremidade 3'. Desta forma, apenas os fragmentos que possuem os sítios de restrição de Eco RI e Mse I serão amplificados, aumentando a proporção dos fragmentos de interesse. A população de fragmentos pré-amplificados constituirá o DNA molde para as reações subseqüentes de amplificação seletiva, com utilização de *primers* que contêm a seqüência dos *primers* pré-seletivos acrescida de dois nucleotídeos arbitrários na sua extremidade 3'. Os produtos amplificados são separados em gel de seqüenciamento, com resolução de um par de base. A detecção dos fragmentos amplificados é feita pela marcação radioativa ou fluorescente de um dos *primers* seletivos. O polimorfismo gerado por esta técnica é preferencialmente dominante, com possibilidade de identificação de indivíduos heterozigotos pela diferença de intensidade das bandas.

Os organismos eucariotos são caracterizados pela ocorrência de grandes quantidades de seqüências repetidas de nucleotídeos de várias classes em seu genoma. As classes encontradas são seqüências de DNA curtas (2 a 4 bp), repetidas em tandem, denominadas seqüências simples repetitivas (SSR) ou microssatélites (LITT e LUTY, 1989). Regiões contendo seqüências simples repetitivas são amplificadas individualmente por meio de PCR utilizando-se um par de *primers* específicos (de 20 a 30 pares de bases) complementares a seqüências únicas que flanqueiam o microssatélite. Em razão da expressão co-dominante e o multialelismo, os marcadores SSR são os que possuem os mais elevados conteúdos de informação de polimorfismos (MORGANTE et al., 1994).

2.4. Mapeamento genético

O mapeamento genômico de uma espécie consiste na produção de um conjunto ordenado de informações sobre as seqüências de DNA, que cobrem todo o genoma. O mapeamento genético é baseado na hipótese de que a co-transmissão de dois marcadores reflete a proximidade entre eles, criando a possibilidade de se ordenar linearmente a informação genética ao longo dos cromossomos e de se determinar a distância entre os genes em

um grupo de ligação. A determinação da distância e da ordem é feita com base na taxa de recombinação genética.

Mapas genéticos de marcadores moleculares oferecem a possibilidade de estudar a arquitetura de características quantitativas, ou seja, identificar, mapear e medir a magnitude do efeito dos principais fatores genéticos envolvidos no controle destas características e, potencialmente, manipular estes fatores em base individual durante os procedimentos de seleção e recombinação genética. A construção de um mapa baseia-se na existência de variação na constituição genética de uma população. Os marcadores genéticos são ferramentas para conhecer e manipular essas variações, que são estudadas a partir de cruzamentos apropriados. Esses cruzamentos possibilitam a ocorrência de *crossing-over* entre marcadores genéticos e são usados para gerar as populações segregantes. No mapeamento do genoma de uma espécie tem sido utilizado a integração de diversos tipos de marcadores, incluindo os morfológicos, isoenzimáticos, bem como os RAPD, RFLP e AFLP (CHAPARRO et al., 1994; KEIM, 1997). Outro marcador molecular que vem sendo muito usado na construção de mapas genéticos são os microssatélites (MORGANTE et al., 1994).

Mapas de ligação são construídos pela análise da segregação dos marcadores em uma população segregante, isto é, em desequilíbrio de ligação gênica. Tais populações podem ser oriundas de retrocruzamento, de F_2 ou do cruzamento entre indivíduos heterozigotos. Linhagens recombinantes endogâmicas (RIL's), obtidas por autofecundações sucessivas de indivíduos F_2 até atingirem níveis desejáveis de homozigose, são também utilizadas na construção de mapas. A escolha da população depende do hábito reprodutivo da espécie e do objetivo do estudo. A população F_2 apresenta indivíduos com todas as possíveis combinações alélicas (AA, Aa e aa). Esta característica possibilita a estimativa do mecanismo de ação gênica e das interações com outros locos. Em populações recombinantes endogâmicas (RIL's), os indivíduos apresentam um elevado índice de homozigose. A ausência de heterozigose é, em parte, compensada pelos ciclos sucessivos de autofecundação, que criam maiores oportunidades de ocorrer recombinação, em comparação com populações F_2 . Nas populações RIL's, o genótipo dos indivíduos é perpetuado. Assim,

um mesmo genótipo pode ser avaliado em locais diferentes, o que possibilita a quantificação da interação genótipo x ambiente, além do intercâmbio entre informações genéticas geradas por diferentes grupos de pesquisa.

O número de marcadores moleculares necessários para construir um mapa genético depende do tamanho do genoma, do número de cromossomos e da frequência de recombinação genética. Um mapa pode ser considerado completo quando o número de grupos de ligação obtidos, pela análise dos marcadores, for igual ao número de cromossomos gaméticos do organismo, e quando todos os marcadores genéticos mapeados estejam ligados, sugerindo que todas as regiões do genoma estão representadas.

No contexto do mapeamento de características quantitativas, os progenitores são selecionados em função dos respectivos fenótipos contrastantes para as características de interesse. Os marcadores que são capazes de detectar alelos diferentes entre as linhagens genitoras são avaliados pelo teste do qui-quadrado, e aqueles que apresentarem segregação Mendeliana são submetidos às análises na população segregante. Estes marcadores são agrupados pela análise de dois pontos e, posteriormente, ordenados em cada grupo de ligação pela análise de três pontos através de vários algoritmos para a construção de mapas genéticos como o MapMaker (LANDER et al., 1987), GMendel (LIU e KNAPP, 1992), JoinMap (STAM, 1993) e QMol (Cruz et al., 2000).

2.4.1. Mapeamento de caracteres de herança quantitativa

O maior impacto da tecnologia de seleção por marcadores é esperado para características quantitativas. Seleção indireta com base em marcadores deve ser avaliada considerando-se simultaneamente a intensidade de seleção, herdabilidade, correlações genéticas, duração de uma geração de melhoramento e o custo relativo de cada alternativa. A eficiência de características de baixa herdabilidade pode ser incrementada com o uso de marcadores moleculares associados cuja herdabilidade é próxima de 1 (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1996).

A grande maioria das características herdáveis de importância agrônômica resulta de uma ação conjunta de vários genes. Estas características são denominadas poligênicas, quantitativas ou de herança complexa. Para a maioria destas características, poucas informações existem sobre o número, posição cromossômica, magnitude do efeito e interações dos locos que controlam a sua expressão. Estes locos são denominados “QTL – Quantitative Trait Loci”, ou seja, locos controladores de características quantitativas (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1996).

A determinação de ligação genética entre marcadores e QTLs depende da existência de desequilíbrio de ligação entre os alelos no loco marcador e alelos do QTL. Este desequilíbrio permite que efeitos quantitativos associados ao marcador sejam detectados e estimados por meio de análises estatísticas adequadas. Desequilíbrio de ligação entre dois locos ocorre quando as freqüências genotípicas dos gametas diferem do produto das freqüências dos alelos componentes desses gametas, denotando a existência de uma associação significativa entre os dois locos (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1996).

O uso de marcadores moleculares facilitou grandemente o estudo de características herdadas quantitativamente e tem tornado possível analisar poligenes para cada característica em fatores mendelianos individuais. Com a utilização de ligação molecular de mapas genéticos e da tecnologia de mapeamento de QTL's, é possível estimar o número de locos que controlam a variação genética em uma população segregante e caracterizar este locos com respeito a sua posição no genoma, efeitos fenotípicos, efeitos pleotrópicos e interações epistáticas com outros QTL's (XIAO et al., 1996).

Os pontos de corte para determinar a significância de um possível QTL dentro de um intervalo testado têm sido obtidos por testes de permutação (DEORGE e CHURCHILL, 1996). Este teste é realizado, embaralhando-se os valores da característica quantitativa que está sendo analisada e repetindo a análise. Repetindo-se este procedimento muitas vezes (1.000 vezes ou mais), encontram-se valores de LOD ou razão de verossimilhança em número igual ao de testes realizados. Utiliza-se então como ponto de corte, o valor encontrado, que se situa na posição do nível de significância adotado. Por exemplo, se forem realizadas 1.000 permutações,

obtem-se um quadro com 1.000 valores de LOD. Se for adotado o nível de significância de 95%, o ponto de corte será o valor de LOD na posição 950, contando que os valores estejam agrupados em ordem crescente de valor. Isto significa que em somente 5% das possíveis combinações de valores da característica, o valor de LOD será igual ou superior àquele adotado como ponto de corte, portanto, a probabilidade do marcador estar ligado ao QTL é grande.

SCHUSTER et al. (2001) trabalharam com populações BC₃F_{2:3} e F_{2:3} provenientes de cruzamento entre o cultivar Hartwig e a linhagem BR-92-31983. A família F_{2:3} foi obtida de sementes F₂ provenientes do cruzamento entre 2 BC₃F_{2:3}. O cultivar Hartwig é resistente e a linhagem BR-92-31983 susceptível à raça 14 do nematóide do cisto de soja (NCS). Com a utilização de dois bulks de DNA (bulked segregant analyses) das plantas BC₃F_{2:3}, contrastantes para a característica de resistência ao NCS, foram identificados quatro marcadores RAPD (OPAA11₇₉₅, OPAE08₈₃₇, OPR-07₅₄₈ e OPY-07) e quatro marcadores microssatélites (Satt082, Sat-001, Satt574 e Satt301) associados à resistência ao NCS. Com a utilização de famílias F_{2:3}, foi mapeado um loco que explica mais de 40% da resistência ao NCS raça 14. A eficiência de seleção desses marcadores foi semelhante à obtida por métodos convencionais. O QTL foi localizado no grupo de ligação D2 e em conjunto com outros QTLs já identificados pode contribuir com os conhecimentos genéticos relacionados à resistência dessa importante doença da cultura da soja.

O uso de marcadores moleculares para identificar locos relacionados com características quantitativas tem grande eficiência na seleção de algumas características no melhoramento de plantas. Por meio de metodologia RFLP, LEE et al. (1996) identificaram locos associados com altura de plantas e enchimento de grãos no grupo de ligação L. O QTL encontrado teve um efeito de 67,7% do total de variação da altura de plantas e 54,6% para enchimento de grãos. A herdabilidade obtida para esta característica foi de 78,8%, indicando que a maioria da variação desta característica foi explicada por este QTL. Para a característica dias para maturação, foram identificados dois QTLs em dois intervalos distintos, no

grupo de ligação K, que explicam 31,2% e 26,6% a variação desta característica respectivamente.

ORF et al. (1999) trabalharam com marcadores moleculares microssatélites e marcadores RFLP em soja. Foram avaliadas características agronômicas em três populações RIL's provenientes dos cruzamentos entre os cultivares Minsoy e Noir, Minsoy e Archer e Noir e Archer. As características avaliadas foram: altura de plantas, enchimento de grãos, dias para florescimento, dias para o período reprodutivo, dias para maturação, produção, teor de óleo e proteína e comprimento de folhas. Foram utilizados marcadores RFLP e microssatélites. Foram identificados QTLs para todas as características avaliadas, com utilização de $LOD \geq 3$ em 17 dos 20 grupos de ligação presentes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material genético

Foi utilizada uma população de 118 RIL's ("Recombinant Inbred Lines" ou Linhagens Recombinantes Endogâmicas), avaliada em quatro ambientes diferentes. Estas linhagens endogâmicas foram obtidas por meio do cruzamento entre as variedades BARC-8 e Garimpo. Estas variedades são contrastantes para as características agronômicas altura da planta na maturação, altura da inserção da primeira vagem, altura da primeira vagem, número de nós na maturação, número de vagens por planta, número de sementes por planta, peso de sementes por planta, peso de 100 sementes, número de dias para maturação e teor de proteínas. BARC-8 é um genótipo com alto teor de proteína (em torno de 50%) e a variedade Garimpo é um genótipo com teor normal de proteínas (em torno de 36%). As RIL's foram obtidas pela descendência, a partir da geração F_2 , de uma única semente de cada planta, SSD ("single seed descent"). A geração F_6 , obtida no ano agrícola de 1999/2000, e a geração F_7 , obtida no ano agrícola 2000/2001, constituíram os materiais genéticos utilizados neste trabalho.

As populações de RIL's foram plantadas em quatro ambientes diferentes: Viçosa-MG, 1999; Cascavel-PR, 1999; Viçosa-MG, 2000 e São Gotardo-MG, 2000. Nos experimentos foi utilizado o delineamento de famílias com testemunhas intercaladas com os progenitores como

testemunhas. Em cada ambiente foi plantada uma repetição de cada família e uma repetição das testemunhas a cada dez linhas de famílias.

Foram coletadas folhas de cinco plantas de cada família e dos progenitores no experimento de Viçosa, 1999, para extração, amplificação de DNA e análises posteriores.

3.2. Análise das características agronômicas

Foram avaliadas as seguintes características agronômicas: altura da planta na maturação, altura da inserção da primeira vagem, altura da primeira vagem, número de nós na maturação, número de vagens por planta, número de sementes por planta, peso de sementes por planta, peso de 100 sementes, número de dias para maturação e teor de proteínas.

O teor de proteínas das sementes de cada família e dos progenitores foi determinado tomando-se uma amostra de cinco plantas por família. A determinação foi feita com utilização do método Kjeldahl modificado, segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Na fase de digestão, após a obtenção de 3g do material aparentemente digerido com ácido sulfúrico, foi adicionado o peróxido de hidrogênio 30%, e a mistura foi levada ao aquecimento por mais 30 minutos. Na fase de destilação, a amônia liberada foi recolhida em solução de ácido bórico 4%. O conteúdo de nitrogênio foi obtido pela titulação da amônia com ácido clorídrico 0,05%. A partir do conteúdo de nitrogênio calculou-se a porcentagem de proteína da amostra, empregando-se o fator de nitrogênio 6,25 para o material analisado. Os resultados dos teores de proteína foram expressos com base na matéria seca, obtida pela secagem em estufa a 105 °C, por 24 horas.

3.3. Análise de variância

3.3.1. Análise de variância individual

As análises de variância para cada ambiente foram realizadas pelo procedimento de avaliação de famílias com testemunhas intercalares, com

os progenitores BARC-8 e Garimpo, utilizados como testemunhas. Este modelo de análise de variância é útil quando não se dispõe de repetições nas parcelas a serem avaliadas. As testemunhas adicionais foram utilizadas para estimar os efeitos ambientais (resíduo) dos experimentos. Para as testemunhas, o modelo adotado foi o seguinte:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

em que

Y_{ij} : é o valor da característica para a i -ésima testemunha na j -ésima repetição;

μ : é a média geral das testemunhas;

T_i : é o efeito da i -ésima testemunha ($i=1,2,\dots,t$); e

e_{ij} : erro aleatório que incide sobre as testemunhas, sendo $e_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$.

Para as famílias, foi adotado o seguinte modelo:

$$y_i = \mu_f + F_i + e_i$$

em que

y_i : é o valor da característica na i -ésima família;

μ_f : é a média geral das famílias;

F_i : é o efeito da i -ésima família ($i=1,2,\dots,f$);

e_i : é o erro aleatório que incide sobre as famílias, sendo $e_i \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$.

O esquema de análise de variância é ilustrado no Quadro 1.

Quadro 1 – Análise de variância para cada ambiente, adotando-se o modelo de ensaios de famílias com testemunhas intercalares

FV	GL	SQ	QM	E(QM)	F
Famílias	f-1	SQF	QMF	$\sigma^2 + \sigma^2 g$	QMF/QMR
Testemunhas	t-1	SQTe	QMTe	$\sigma^2 + r\phi$	QMTe/QMR
Resíduo	t(r-1)	SQR	QMR	σ^2	

As somas de quadrados para testemunhas e resíduo foram obtidas de forma usual para ensaios inteiramente ao acaso, ou seja:

$$SQTe = \frac{1}{r} \sum_{i=r}^t Y_i^2 - C$$

$$C = \frac{Y_{..}^2}{rt}$$

$$SQR = SQTo - SQTe$$

$$SQTo = \sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^r Y_{ij}^2 - C$$

A soma de quadrados para famílias foi obtida pela expressão:

$$SQF = \sum_{i=1}^f y_i^2 - \frac{1}{f} \left(\sum_{i=1}^f y_i \right)^2$$

A herdabilidade, no sentido amplo, e o coeficiente de variação experimental, foram obtidos pelas seguintes expressões:

$$h^2 = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{QMF} = \frac{QMF - QMR}{QMF}$$

$$CVe = \frac{100 \sqrt{QMR}}{\hat{\mu}}$$

3.3.2. Análise de variância conjunta

Na análise conjunta dos diferentes ambientes, também foram utilizados dois modelos de análise de variância, um para as testemunhas e outro para as famílias. Para as testemunhas, o modelo de análise de variância consistiu em uma análise fatorial. Foram quantificadas a variação entre as testemunhas e a variação devido à interação com o ambiente. Na análise de variância das famílias em dois ambientes, foi adotado um modelo de análise similar a análise em blocos ao acaso. Cada ambiente

correspondeu a um bloco, e a SQR foi interpretada como a interação Família x Ambiente. O resíduo da análise conjunta foi obtido pela análise das testemunhas. Com este modelo foi obtida a soma de quadrados de grupos (SQGr) que testa o contraste entre as médias das famílias e das testemunhas avaliadas.

Para as testemunhas, o modelo adotado foi o seguinte:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A_k + T_i A_k + e_{ijk}$$

em que

Y_{ijk} : é o valor da característica para a i -ésima testemunha na j -ésima repetição, no k -ésimo ambiente;

μ : é a média geral das testemunhas;

T_i : é o efeito da i -ésima testemunha ($i=1,2,\dots,t$);

A_k : é o efeito do k -ésimo ambiente ($k=1,2$);

$T_i A_k$: é o efeito da interação entre a i -ésima testemunha e o k -ésimo ambiente; e

e_{ijk} : erro aleatório que incide sobre as testemunhas, sendo $e_{ijk} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$.

Para as famílias foi adotado o seguinte modelo:

$$Z_{ik} = \mu + F_i + A_k + F_i A_k + e_{ik}$$

em que

Z_{ik} : é o valor da característica para a i -ésima família no k -ésimo ambiente;

μ : é a média geral das famílias;

F_i : é o efeito da i -ésima família ($i=1,2,\dots,f$);

A_k : é o efeito do k -ésimo ambiente ($k=1,2$);

$F_i A_k$: é o efeito da interação entre a i -ésima família e o k -ésimo ambiente; e

e_{ik} : erro aleatório que incide sobre as famílias, sendo $e_{ik} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$, e $e_{ik} = e_{ijk}$.

O esquema de análise de variância conjunta é ilustrado no Quadro 2.

Quadro 2 – Esquema de análise de variância conjunta em vários ambientes, nos quais são avaliadas testemunhas com repetição em cada ambiente, e famílias sem repetição em cada ambiente

FV	GL	SQ	QM	F
Ambiente (A)	a-1	SQA	QMA	QMA/QMR
Testemunha (Te)	t-1	SQTe	QMTe	QMTe/QMR
Te X A	(a-1)(t-1)	SQTe x A	QMTe x A	QMTe x A/QMR
Famílias (F)	f-1	SQF	QMF	QMF/QMR
F X A	F(a-1)-1	SQF x A	QMF x A	QMF x A/QMR
Grupo	1	SQGr	QMGr	QMGr/QMR
Resíduo	atr-at	SQR	QMR	
Total	(rat+af)-1 #	SQTo		

Quando o número de repetições é diferente nos vários ambientes:

$$GL_{total} = \sum_{i=1}^a (tr + f) - 1$$

$$GL_{resíduo} = \sum_{i=1}^a (rt - t)$$

As somas de quadrados foram obtidas pelas seguintes expressões:

$$SQ_{To} = \sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^r \sum_{k=1}^a Y_{ijk} - C$$

sendo $C = \frac{Y_{...}}{N}$

em que

$$Y_{...} = \text{Total geral};$$

$$N = rat+af \text{ ou}$$

$$\sum_{i=1}^a (tr + f) \text{ quando o número de repetições é diferente nos diversos}$$

ambientes.

$$SQR = \sum_{k=1}^a SQR_k \text{ em que } SQR_k \text{ é a SQR no ambiente } K.$$

$$SQA = \sum_{i=1}^a \frac{1}{f} \left(\sum_{k=1}^a \frac{Y_{..k}^2}{t} + \sum_{k=1}^a \frac{Z_k^2}{f} \right) - C$$

em que

$Y_{..k}$ = Total das testemunhas no ambiente k ;

Z_k = Total das famílias no ambiente k .

$$SQTe = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^t \frac{1}{f} Y_{i..}^2$$

sendo $Ct = \frac{Y_{...}^2}{\sum_{i=1}^a rt}$, $Y_{i..}$ o total das testemunhas em cada ambiente e $Y_{...}$ o

total das testemunhas.

$$SQTe_{A^*} = SQTe_{A^*} - (SQTe + SQA^*)$$

Sendo

$$SQA^* = \sum_{k=1}^a \frac{1}{rt} Y_{..k}^2 - Ct$$

sendo $Y_{..k}$ o total de cada testemunha nos vários ambientes.

$$SQTe_{A^*} = \sum_{i=1}^t \sum_{k=1}^a \frac{1}{rt} Y_{i.k}^2 - Ct$$

sendo $Y_{i.k}$ o total de cada testemunha em cada ambiente.

SQA^* é a soma de quadrados de ambiente considerando apenas as testemunhas (não envolve informações de famílias).

$$SQGr = \frac{Y_{...}^2}{\sum_{i=1}^a r_i} + \frac{Z_{..}^2}{fa} - C$$

$$SQF = \frac{1}{a} \sum_{i=1}^f Z_{i.}^2 - Cf$$

em que $Cf = \frac{Z_{..}^2}{fa}$, sendo $Z_{..}$ o total de cada famílias nos vários ambientes e

$Z_{i.}$ o total de cada família somando os vários ambientes.

$$SQA^{**} = \frac{1}{f} \sum_{k=1}^f Z_{.k}^2 - Cf$$

sendo $Z_{.k}$ o total de cada ambiente, considerando apenas as famílias.

$$SQF, A^{**} = \sum_{i=1}^f \sum_{k=1}^a Z_{ik}^2 - Cf$$

$$SQFxA = SQF, A^{**} - (SQF + SQA^{**})$$

SQA^{**} e $SQTo^{**}$ são as somas de quadrados de ambiente e total, considerando apenas as famílias.

O coeficiente de variação experimental foi obtido pela expressão:

$$CVe = \frac{100 \sqrt{QMR}}{\hat{\mu}}$$

A variância genética, e a herdabilidade no sentido amplo, foram obtidas por:

$$h^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + \sigma^2}$$

$$\hat{\sigma}_g^2 = \frac{QMF - QMR}{a}$$

em que

$$\hat{\sigma} = \text{QMR}$$

sendo que estas estimativas foram obtidas com base nas médias das famílias.

3.4. Extração de DNA

Para a extração do DNA, cinco folhas obtidas de cada família foram coletadas, embaladas em alumínio, congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80°C. A extração do DNA de folhas de soja foi feita com a utilização de protocolo descrito por DOYLE e DOYLE (1990), com algumas modificações. Cerca de 200 a 300 mg de folhas foram trituradas na presença de N₂ líquido e transferido para tubos Eppendorf. Após a adição de 650-800 µL de tampão de extração, constituído de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 50 mM pH 8,0, NaCl 0,7M, β-mercaptoetanol 1% (v/v) e CTBA 1% p/v. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por uma hora, centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante transferido para outros tubos.

Ao sobrenadante foi adicionado igual volume da mistura de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram suavemente invertidos e centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm. A fase superior foi transferida para outros tubos e o DNA foi precipitado com a adição de 2/3 do volume obtido de isopropanol gelado. O isopropanol foi descartado, sendo adicionado 650 µL de etanol gelado (95%) ao precipitado. Após o descarte do etanol, o precipitado foi seco ao ar, em seguida adicionado TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0), e incubado a 37° C por 30 minutos com RNase na concentração final de 40 µg/mL. Em seguida o DNA foi recuperado por precipitação, mediante a adição de 30 µL de NaCl 5M e 200 µL de isopropanol gelado aos tubos, seguido de centrifugação à 14.000 RPM, por 10 minutos. Após a lavagem do precipitado sucessivamente com etanol 90% e 70% gelados e secagem ao ambiente, adicionou-se 200-300 µl de água ao DNA.

A concentração do DNA foi estimada espectrofotometricamente por leitura da absorbância a 260 nm. Cada unidade de absorbância corresponde à concentração de 50 µg/ml de DNA fita dupla (SAMBROOK et al., 1989).

A integridade do DNA foi determinada em gel de agarose 0,8%, fotografado sobre luz ultravioleta.

3.5. Amplificação e eletroforese

As reações de amplificação de microssatélites foram feitas em um volume total de 15 µl, contendo Tris-HCl pH 8,3 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 100 µM de cada um dos deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,2 µM de cada primer (Reserach Genetics, Huntsville, AL, EUA), uma unidade de TaqDNA-polimerase e 30 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador programado para uma etapa inicial de 7 minutos a 72°C, seguida de 30 ciclos de um minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C e 2 minutos a 72°C. Por fim, uma etapa de 7 minutos a 72°C. Os fragmentos amplificados de microssatélites foram separados por eletroforese em géis de agarose 3,0% ou poliacrilamida 8%. Os géis de poliacrilamida 8% foram utilizados para os “primers” que após realizada a amplificação, não foi possível a separação dos fragmentos por meio dos géis de agarose 3%. Nos géis de poliacrilamida foi adicionado o polímero spreadex 10%, que possui a função de aumentar a eficiência na separação dos fragmentos. A eletroforese foi realizada com a utilização de tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 2mM), pH 8,3 a 100 volts. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta, pelo sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene).

3.6. Identificação e mapeamento de QTL's

Os marcadores microssatélites foram codificados como homozigotos para os alelos vindos de Garimpo (A), homozigotos para os alelos vindos de Barc 8 (B) e falhas (-) das bandas amplificadas em cada um dos 118 indivíduos da população. O programa utilizado para o mapeamento dos microssatélites e o estabelecimento dos grupos de ligação, MAPMAKER

(LINCOLN et al., 1992), foi desenvolvido para linhagens endogâmicas, que não apresentam locos em heterozigose. Nas populações (gerações F₆ e F₇) estudadas foi observada pequena frequência de famílias heterozigotas para as características avaliadas que foram então descartadas. A segregação de cada fragmento polimórfico foi testada na população por meio do teste qui-quadrado. Apenas os fragmentos cuja segregação se ajustou à proporção esperada 1:1 (P<0,05) foram utilizados nas análises posteriores.

Os marcadores foram agrupados com utilização de LOD mínimo de 5,0 e frequência máxima de recombinação de 0,40. A distância de mapeamento de Kosambi foi utilizada para a conversão da frequência de recombinação para centiMorgans (cM). As informações do mapa de ligação foram utilizadas para mapear os QTL's ao longo dos grupos de ligação por meio do mapeamento por intervalo composto (ZENG, 1993 e 1994, JANSEN, 1993), utilizando-se o programa QTL Cartographer (BASTEN et. al., 1994 e 1999). Este tipo de metodologia diferencia-se do mapeamento por intervalo clássico, por isolar o efeito de outros QTL's ligados ou não ao intervalo. O mapeamento por intervalo composto é um híbrido entre o mapeamento por intervalos e a técnica de regressão múltipla. O seguinte modelo é adotado:

$$y_j = \beta_0 + \beta^* x_j^* + \sum \beta_k x_{jk} + \epsilon_i$$

em que

y_j = valor da característica no j-ésimo indivíduo;

β_0 = média do modelo;

β^* = efeito do QTL, expresso como a diferença entre os dois homozigotos;

x_j^* = é uma variável indicadora assumindo valores -1 ou 1, com probabilidade dependendo do genótipo dos marcadores i e j, e da posição que está sendo testada no intervalo entre estes marcadores (Quadro 3, ignorando recombinações duplas dentro do intervalo);

β_k = coeficiente de regressão parcial entre o fenótipo y e o marcador k;

x_{jk} = é um coeficiente conhecido para o k-ésimo marcador, no j-ésimo indivíduo, assumindo valores -1 e 1, dependendo do genótipo dos marcadores; e

ε_i = variável aleatória.

Os coeficientes β_k e x_{jk} são utilizados para controlar o background genético, eliminando os efeitos de outros possíveis QTL's sobre β^* .

A significância de um QTL é atribuída pela razão de verossimilhança entre a hipótese de existência do QTL e a hipótese de que nenhum QTL existe em determinada posição do mapa de ligação. A razão de verossimilhança possui uma aproximação com o χ^2 pela seguinte expressão:

$$-2\ln \Lambda \cong \chi^2 \alpha$$

onde Λ representa a razão de verossimilhança, e α o nível de significância para o χ^2 .

A razão de verossimilhança é representada, na maioria das vezes, por seu logaritmo natural (LOD). O ponto de corte do LOD para considerar a presença de um QTL pelo método de mapeamento por intervalo composto foi obtido por meio da seguinte expressão:

$$\text{LOD} = \chi^2_{(1)} \alpha / 2 \ln(10).$$

No mapeamento de RIL's por intervalo composto, o χ^2 possui um grau de liberdade, pois o denominador da expressão de verossimilhança possui um parâmetro a mais do que o numerador.

Quadro 3 – Especificações da variável indicadora x^* , para o modelo de mapeamento por intervalo composto, utilizando RIL's

Grupo	Genótipo do Marcador		Nº de indivíduos	x^*
	i	i+1		
1	+	+	n1	1
2	+	-	n2	{ 1 com probabilidade 1-p -1 com probabilidade p
3	-	+	n3	
4	-	-	n4	{ 1 com probabilidade p -1 com probabilidade 1-p

+ indica genótipo homozigoto para o progenitor 1 e - indica homozigoto para o progenitor 2.

$p = r_{iq}/r_{i(i+1)}$ onde r_{iq} é a frequência de recombinação entre o marcador i e a posição que está sendo testada no intervalo, e $r_{i(i+1)}$ é a frequência de recombinação entre o marcador i e o marcador $i+1$. Recombinações duplas no intervalo entre estes marcadores são ignoradas.

Considerando que α_M , α_C e α_I são os níveis de significância para o mapa, para o cromossomo e para um intervalo particular, respectivamente, temos a seguinte relação entre eles (Zeng, 1994).

$$\alpha_C = 1 - (1 - \alpha_M)^{1/C} \cong \alpha_M/C^*$$

$$\alpha_I \cong \alpha_C/M$$

Desta forma, mesmo um nível de significância não muito rigoroso para o mapa, pode levar a um nível de significância muito drástico para cada intervalo, aumentando a chance de se cometer o erro tipo II. Por este motivo, como foram identificados 17 grupos de ligação, o nível de significância utilizado para o mapa de foi de 10%, que leva a um nível de significância de 0,00588% para cada grupo de ligação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção dos *primers* de microssatélites

Os *primers* de microssatélites foram inicialmente testados nos progenitores com a finalidade de selecionar aqueles que produzissem fragmentos polimórficos e que pudessem ser mapeados na população segregante.

Foram testados 593 pares de *primers* de microssatélites das quais 147 apresentaram polimorfismo nos progenitores e 81 apresentaram polimorfismo nos progenitores e na população segregante. A Figura 1 mostra um loco polimórfico entre os progenitores e em 28 linhas recombinantes da população.

A maioria dos *primers* que foram polimórficos entre os progenitores e não apresentaram polimorfismos na população segregante, apresentaram o alelo do progenitor BARC-8 em toda a população (Figura 2). Um dos genótipos utilizados como progenitor para obtenção das RIL's foi a variedade Garimpo. Pelo fato de não dispormos de sementes do progenitor Garimpo, utilizamos a variedade Garimpo RCH para detectar os polimorfismos. Este fato pode ter sido responsável pela ausência de polimorfismo na população, apesar de ter sido detectado polimorfismo nos progenitores. A variedade Garimpo RCH foi obtida por meio do método de melhoramento dos retrocruzamentos com a utilização da variedade Garimpo como progenitor

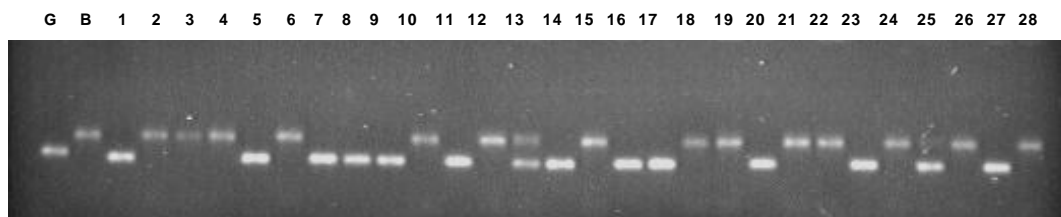


Figura 1 – Análise eletroforética em gel de agarose 3%, de fragmentos de DNA, obtida por amplificação de microssatélites. As canaletas G e B correspondem aos cultivares Garimpo e Barc-8, respectivamente. As canaletas de 1 a 28 correspondem aos RIL's derivados do cruzamento entre G e B. A linha 13 apresenta um exemplo de heterozigose.

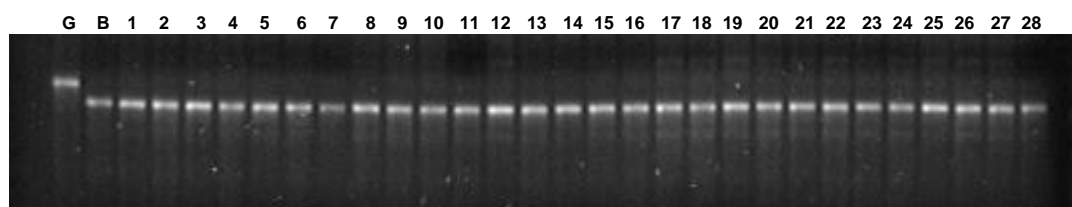


Figura 2 – Análise eletroforética em gel de agarose 3%, de fragmentos de DNA, obtida por amplificação de microssatélites. As canaletas G e B correspondem aos cultivares Garimpo e Barc-8, respectivamente. As canaletas 1 a 28 apresentam ausência de polimorfismo na população de RIL's.

recorrente. Existe a possibilidade de haver pequena divergência genética entre estes dois genótipos. O número de retrocruzamentos efetuados talvez não tenha sido suficiente para a completa recuperação do genoma da variedade Garimpo na variedade Garimpo RCH.

A segregação dos marcadores foi testada por meio do teste de qui-quadrado ($P < 0,05$), e dos 81 *primers*, 80 apresentaram fragmentos polimórficos que segregaram na proporção Mendeliana esperada de 1:1 depois de descartados os indivíduos heterozigotos (Quadro 4). Como não se esperam heterozigotos em RIL's, e o programa que gera o mapa não aceita heterozigotos quando os dados são codificados como RIL's, os locos heterozigotos foram eliminados da análise.

Quadro 4 – Teste do qui-quadrado (χ^2) para a segregação dos marcadores. A letra A representa o alelo presente em Garimpo e a B, alelo presente em BARC-8

Primer	Alelo			c ²	P%	Primer	Alelo			c ²	P%
	A	B	Total				A	B	Total		
Sat-117	45	66	111	0,99	31,89	Satt300	59	56	115	0,02	88,88
Satt144	47	63	110	0,58	44,56	Satt304	59	53	112	0,08	77,68
Satt055	48	63	111	0,51	47,65	Satt325	62	54	116	0,14	71,03
Satt186	55	53	108	0,01	92,32	Satt333	55	63	118	0,14	71,27
Sat-091	46	67	113	0,98	32,33	Satt345	66	52	118	0,42	51,93
Sat-135	67	48	115	0,78	37,57	Satt369	65	51	116	0,42	51,57
Sat-105	55	60	115	0,05	81,57	Satt318	57	60	117	0,02	88,97
Sat-084	43	70	113	1,61	20,41	Satt384	54	56	110	0,01	92,40
Sat-085	55	59	114	0,04	85,14	Satt353	58	56	114	0,01	92,54
Sat-112	54	53	107	0,00	96,14	Satt377	57	58	115	0,00	96,28
Satt190	54	56	110	0,01	92,40	Satt399	55	61	116	0,08	78,06
Satt164	64	48	112	0,57	44,97	Satt422	55	61	116	0,08	78,06
Satt167	48	62	110	0,45	50,45	Satt441	50	64	114	0,43	51,21
Satt183	55	61	116	0,08	78,06	Satt449	56	59	115	0,02	88,88
Satt153	68	46	114	1,06	30,29	Satt462	53	62	115	0,18	67,48
Satt146	46	61	107	0,53	46,84	Satt468	59	58	117	0,00	96,31
Satt181	55	55	110	0,00	100	Satt475	51	65	116	0,42	51,57
Satt184	58	47	105	0,29	59,14	Satt476	59	53	112	0,08	77,68
Satt012	63	50	113	0,37	54,09	Satt495	59	57	116	0,01	92,60
Satt129	55	62	117	0,10	74,63	Satt506	59	59	118	0,00	100
Satt123	60	42	102	0,79	37,29	Satt514	49	63	112	0,44	50,83
Satt147	52	57	109	0,06	81,08	Satt520	61	54	115	0,11	74,41
Satt139	53	58	111	0,06	81,24	Satt522	55	61	116	0,08	78,06
Satt193	62	52	114	0,22	63,96	Satt523	51	60	111	0,18	66,93
Satt199	57	54	111	0,02	88,68	Satt526	54	62	116	0,14	71,03
Satt216	51	56	107	0,06	80,90	Satt527	52	58	110	0,08	77,48
Satt226	53	52	105	0,00	96,11	Satt528	58	57	115	0,00	96,28
Satt232	53	52	105	0,00	96,11	Satt529	59	59	118	0,00	100
Satt241	59	41	100	0,81	36,81	Satt531	68	49	117	0,77	37,98
Satt276	53	55	108	0,01	92,33	Satt538	61	57	118	0,03	85,39
Satt277	67	47	114	0,88	34,90	Satt549	52	65	117	0,36	59,79
Satt281	56	54	110	0,01	92,40	Satt594	63	55	118	0,14	71,27
Satt303	49	57	106	0,15	69,76	Satt518	58	58	116	0,00	96,11
Satt215	54	58	112	0,86	35,10	Satt350	56	61	117	0,00	96,11
Satt454	65	47	112	2,89	11,50	Satt082	59	53	112	0,44	50,83
Satt286	46	64	110	2,63	13,30	Satt282	58	54	112	0,14	71,03
Satt242	52	56	108	0,24	66,92	Satt338	53	59	112	0,31	61,54
Satt130	51	60	111	0,65	45,07	Satt279	57	59	116	0,03	88,48
Satt272	61	55	116	0,31	61,54	Satt536	56	57	113	0,02	88,68
Satt471	57	58	115	0,02	88,68	Satt537	59	56	115	0,02	36,81

4.2. Mapa de ligação genética

A primeira etapa do processo de confecção do mapa de ligação foi a definição dos parâmetros de LOD e máxima freqüência de recombinação (r) para o agrupamento dos marcadores. Foram adotados os valores de LOD = 5,0 e de $r = 0,40$, por apresentarem uma distribuição mais homogênea dos marcadores entre os grupos de ligação. Com os grupos definidos foi determinada a ordem mais provável dos marcadores em cada grupo de ligação.

Foram obtidos 17 grupos de ligação com 53 marcadores. Os grupos de ligação se apresentaram pouco saturados, com pouca variabilidade intraespecífica. Seria interessante em trabalhos futuros a utilização de outros tipos de marcadores para contribuir para o mapeamento de novos grupos de ligação.

4.3. Análise das características agronômicas

No Quadro 5 estão indicadas as características avaliadas em cada ambiente.

Quadro 5 – Características avaliadas nos ambientes de Viçosa-MG, 1999, Cascavel-PR 1999, Viçosa-MG, 2000 e São Gotardo-MG, 2000

Características	Viçosa (1999)	Cascavel (1999)	Viçosa (2000)	S. Gotardo (2000)
Dias para maturação	X	-	X	X
Altura na maturação	X	X	X	X
Número de nós na maturação	X	X	X	X
Número de vagens por planta	X	X	X	X
Número de sementes por planta	X	X	X	X
Altura da inserção da 1ª vagem	X	-	X	X
Altura da 1ª vagem	X	-	X	X
Peso de sementes por planta	X	X	X	X
Peso de cem sementes	X	X	X	X
Teor de proteína	X	X	-	-

As 118 famílias apresentaram distribuição normal para a maioria das características, principalmente nos ambientes de Viçosa, 1999, Cascavel, 1999 e Viçosa, 2000. Em análise realizada por meio do teste de Lillifors (Quadro 6), observou-se que para a maioria das características, os resultados foram não significativos. A não-significância indica que os valores dos dados analisados seguem distribuição normal, o que indica que vários genes estão envolvidos com as características analisadas nas linhagens de soja. De acordo com essa análise, a maioria das características avaliadas é controlada por vários genes.

Quadro 6 – Teste de Lillifors para as características de dias para maturação (DM), altura das plantas na maturação (AM), número de nós na maturação (NNM), altura da primeira vagem (APV), altura da inserção da primeira vagem (AIPV), número de vagem por planta (NVP), número de sementes por planta (NSP), peso de sementes por planta (PSP), peso de cem sementes (PCS) e teores de proteína (PROT) em 118 famílias endogâmicas recombinantes (RIL's), cultivadas em Viçosa, 1999, Cascavel, 1999, Viçosa, 2000 e São Gotardo, 2000

Características	Viçosa (1999)	Cascavel (1999)	Viçosa (2000)	São Gotardo (2000)
DM	0,064 ^{n.s.}	-	0,168 **	0,164 **
AM	0,101 ^{n.s.}	0,068 ^{n.s.}	0,057 ^{n.s.}	0,067 ^{n.s.}
NNM	0,101 ^{n.s.}	0,067 ^{n.s.}	0,064 ^{n.s.}	0,078 ^{n.s.}
APV	0,045 ^{n.s.}	-	0,065 ^{n.s.}	0,106 **
AIPV	0,056 ^{n.s.}	0,130 **	0,058 ^{n.s.}	-
NVP	0,060 ^{n.s.}	0,091 ^{n.s.}	0,056 ^{n.s.}	0,102 **
NSP	0,073 ^{n.s.}	0,063 ^{n.s.}	0,071 *	0,084 **
PSP	0,051 ^{n.s.}	0,098 **	0,049 ^{n.s.}	0,100 **
PCS	0,106 ^{n.s.}	0,057 ^{n.s.}	0,123 **	0,096 **
PROT	0,128 **	0,116 **	-	-

* Significativo a 5% de probabilidade.

** Significativo a 1% no teste de Lillifors.

As menores variabilidades para as famílias foram obtidas nos ambientes de Viçosa, em 1999 e de São Gotardo, em 2000 (Quadros 7 a 10). No entanto, para o ambiente de Viçosa, 1999, os resultados foram significativos para os progenitores (testemunhas) para a maioria das características, enquanto para o ambiente de São Gotardo, em 2000, os valores dos dados dos progenitores foram não significativos para a maioria das características.

Quadro 7 – Quadrados médios, estimativas de variância genética (σ^2g), herdabilidade (h^2) e coeficientes de variação (CV) para as características de altura da planta na maturação (AM), altura da inserção da primeira vagem (AIPV), número de nós na maturação (NNM), número de vagens por planta (NVP), número de sementes por planta (NSP), peso de sementes por planta (PSP), peso de 100 sementes (PCS) e conteúdo de proteína das sementes (PROT) para o ambiente de Cascavel, PR, 1999

Fonte de Variação	GL	AM	AIPV	NNM	NVP	NSP	PSP	PCS	PROT
Famílias	117	154,08**	8,65*	3,77**	317,43**	1373,85*	22,58 ^{n.s.}	6,42**	9,11**
Testemunhas	1	3922,64**	39,16**	48,44**	6113,84**	19804,46**	299,44**	0,40 ^{n.s.}	1079,24**
Resíduos	15	11,89	3,16	0,79	72,06	544,37	13,69	1,37	2,42
Variância genética		142,19	5,49	5,49	245,37	829,48	8,88	5,05	6,04
Herdabilidade (%)		92,28	63,51	63,51	77,30	60,37	39,34	19,47	82,11
Coeficiente de variação (%)		6,32	20,21	9,44	13,94	18,59	23,72	9,82	2,93

* Significativo a 5% de probabilidade.

** Significativo a 1% no teste F.

Quadro 8 – Quadrados médios, estimativas de variância genética (σ^2g), herdabilidade (h^2) e coeficientes de variação (CV) para as características de dias para maturação (DM), altura de plantas na maturação (AM), número de nós na maturação (NNM), altura de inserção da primeira vagem (AIPV), número de sementes por planta (NSP), peso de sementes por planta (PSP), peso de 100 sementes (PCS) para o ambiente de Viçosa, MG, 1999

Fonte de Variação	GL	DM	AM	NNM	APV	AIPV	NSP	PSP	PCS	PROT
Famílias	117	129,46 ^{n.s.}	275,49 ^{n.s.}	6,22 ^{n.s.}	14,48 ^{n.s.}	16,21 ^{n.s.}	12669,27 ^{n.s.}	278,78 ^{n.s.}	8,96 ^{n.s.}	9,11 ^{**}
Testemunhas	1	900,62 ^{n.s.}	13778,44 ^{**}	325,50 ^{**}	148,73 [*]	102,38 ^{n.s.}	252415,08 ^{**}	4332,60 ^{**}	22,57 ^{n.s.}	1079,24 ^{**}
Resíduos	15	1217,71	781,42	31,75	72,06	25,64	18528,82	321,33	13,16	2,42
Variância genética		0	0	0	0	0	0	0	0	6,69
Herdabilidade (%)		-	-	-	-	-	-	-	-	73,47
Coefficiente de variação (%)		29,42	43,61	39,01	31,85	29,47	41,53	38,38	25,19	3,28

* Significativo a 5% de probabilidade.

** Significativo a 1% no teste F.

Quadro 9 – Quadrados médios, estimativas de variância genética (σ^2g), herdabilidade (h^2) e coeficientes de variação (CV) para as características de dias para maturação (DM), altura de plantas na maturação (AM), número de nós na maturação (NNM), altura da primeira vagem (APV), número de vagem por planta (NVP), número de sementes por planta (NSP), peso de sementes por planta (PSP), peso de 100 sementes (PCS) para o ambiente de São Gotardo, MG 2000

Fonte de Variação	GL	DM	AM	NNM	APV	NVP	NSP	PSP	PCS
Famílias	117	213,44**	128,23 ^{n.s.}	3,19 ^{n.s.}	10,47 ^{n.s.}	89,40 ^{n.s.}	440,59 ^{n.s.}	8,27 ^{n.s.}	3,92 ^{n.s.}
Testemunhas	1	0,83**	448,53 ^{n.s.}	1,63 ^{n.s.}	12,03 ^{n.s.}	54,06 ^{n.s.}	120,90 ^{n.s.}	0,61 ^{n.s.}	0,76 ^{n.s.}
Resíduos	15	48,03	203,04	2,29	17,94	80,24	365,49	7,17	2,49
Variância genética		165,41	0	0,89	0	9,16	75,10	1,10	1,42
Herdabilidade (%)		77,50	-	28,04	-	10,25	17,05	13,29	36,43
Coeficiente de variação (%)		6,70	27,91	13,18	31,74	32,54	30,71	38,92	14,33

* Significativo a 5% de probabilidade.

** Significativo a 1% no teste F.

Quadro 10 – Quadrados médios, estimativas de variância genética (σ^2g), herdabilidade (h^2) e coeficientes de variação (C.V.) para as características de para as características de dias para maturação (DM), altura da planta na maturação (AM), número de nós na maturação (NNM), altura da primeira vagem (APV), altura de inserção da primeira vagem (AIPV), número de vagens por planta (NVP), número de sementes por planta (NSP), peso de sementes por planta (PSP) e peso de 100 sementes (PCS) para o ambiente de Viçosa, 2000

Fonte de Variação	GL	DM	AM	NNM	APV	AIPV	NVP	NSP	PSP	PCS
Famílias	117	484,61 ^{n.s.}	283,76 ^{**}	9,82 ^{**}	21,68 ^{**}	24,50 ^{**}	405,17 [*]	2250,90 ^{**}	42,24 [*]	15,13 [*]
Testemunhas	1	9808,08 ^{**}	25206,70 ^{**}	657,06 ^{**}	612,97 ^{**}	557,28 ^{**}	247666,38 ^{**}	130478,14 ^{**}	2837,30 ^{**}	6,43 ^{n.s.}
Resíduos	15	386,48	95,87	4,16	8,35	11,55	234,66	7,17	27,60	9,39
Variância. genética.		98,13	87,89	5,67	13,33	12,95	170,51	1010,24	19,64	5,74
Herdabilidade. (%)		20,25	66,21	57,69	61,49	52,86	42,08	44,88	41,57	37,95
Coeficiente de variação (%)		17,36	16,41	15,37	21,24	20,25	24,38	26,38	26,04	28,83

* Significativo a 5% de probabilidade.

** Significativo a 1% no teste F.

Na análise de variância conjunta para os quatro ambientes considerados, a maioria das características analisadas foi significativa (Quadros 11 e 12). Este comportamento demonstra que fatores ambientais estão envolvidos na regulação da expressão gênica da maioria das características. Na análise de variância individual, os maiores valores de herdabilidade foram obtidos no ambiente de Cascavel-PR, 1999. Quando se consideram os quatro ambientes, as maiores herdabilidades foram obtidas para as características teor de proteína e altura da planta na maturação. A média do teor de proteínas foi maior no experimento de Cascavel.

As maiores herdabilidades foram obtidas para o ambiente de Cascavel-PR, 1999, seguida de Viçosa-MG, 2000. Para algumas características não foram obtidos valores de herdabilidade (Quadros 8 e 9). A ausência de herdabilidade foi devido à variância zero obtida para estas características nestes ambientes. Este fato pode ser devido a ausência de variabilidade genética, ou falta de precisão experimental, que eleva muito a variância ambiental, não permitindo que a variância genética seja observada. Em geral, variâncias genéticas nulas foram obtidas em experimentos com coeficiente de variação elevado.

Valores de alta herdabilidade significam que grande proporção da variância total é atribuída ao efeito médio dos genes.

Os ambientes de Viçosa-MG, 1999, e São Gotardo-MG, 2000, apresentaram em sua maioria variâncias genéticas baixas ou de valor zero. Foram observados também nestes ambientes resultados não significativos para famílias. Não foi observado, portanto, diferença significativa entre as famílias para a maioria das características avaliadas (Quadro 8 e 9).

Os resultados mostram que fatores ambientais estão envolvidos na regulação da expressão gênica das características avaliadas nos quatro ambientes considerados. Foi observada interação genótipo x ambiente significativa para testemunhas e famílias (Quadros 11 e 12). Somente para as características agronômicas de peso de 100 sementes, altura da primeira vagem e altura da inserção da primeira vagem não foram significativos na interação genótipo x ambiente.

Quadro 11 – Análise de variância conjunta os ambientes de Viçosa, 1999, Cascavel, 1999, Viçosa, 2000 e São Gotardo, 2000, para as características de altura na maturação (AM), número de nós na maturação (NNM), número de vagens por planta (NVP), número de sementes por planta (NSP), peso de sementes por planta (PSP) e peso de 100 sementes (PCS)

Fonte de Variação	GL	AM	GL	NNM	GL	NVP	GL	NSP	GL	PSP
Ambiente (A)	2	3232,74**	3	223,87**	3	69480,47**	3	338356,00**	3	6195,16**
Testemunha (Te)	1	30283,20**	1	667,87**	1	78003,50**	1	351247,30**	1	6243,33**
Te x A	2	1133,49**	3	47,93**	3	14010,24**	3	64120,61**	3	1020,90**
Famílias (F)	117	324,41**	117	6,95**	117	1309,01**	117	5884,03**	117	109,09*
FxA	347	99,17**	345	2,35**	346	286431,0**	344	3372,15**	344	78,60**
Grupo	1	1855530,40**	1	83797,90**	1	3189098,92**	1	14914105,45**	1	286686,21**
Resíduo	87	141528,41	87	4750,87	87	1551073,18	87	7539595,55	87	163113,73
Total	557	1997058,80	555	88548,77	556	4740172,10	554	22453701,00	554	449799,94

* Significativo a 5% de probabilidade.

** Significativo a 1% no teste F.

Quadro 12 – Análise de variância conjunta para os ambientes de Viçosa, 1999, Cascavel, 1999, Viçosa, 2000 e São Gotardo, 2000, para as características de dias para maturação (DM), altura da primeira vagem (APV) e altura da inserção da primeira vagem (AIPV) e conteúdo de proteína (PROT)

Fonte de Variação	GL	PCSEM	GL	DPM	GL	APV	GL	AIPV	GL	PROT
Ambiente (A)	3	53,55**	1	888,77**	1	0,67 ^{n.s.}	2	276,84**	1	2195,98**
Testemunha (Te)	1	2,93 ^{n.s.}	1	6213,31**	1	512,09**	1	369,12**	1	8,77*
Te x A	3	0,71 ^{n.s.}	1	277,21**	1	0,84 ^{n.s.}	2	10,87 ^{n.s.}	1	479,59**
Famílias (F)	117	7,25*	117	159,90**	117	21,62**	117	22,20**	117	12,45**
FxA	344	6,22**	234	39,75**	234	7,81**	242	8,36**	117	4,02*
Grupo	1	88369,91**	1	4243361,82**	1	60053,78**	1	93456,17**	1	21,44**
Resíduo	87	4001,57	72	1170199,22	72	23099,19	76	28689,00	29	1,92
Total	553	92371,48	427	5413561,0	427	83152,97	441	122145,17	267	2724,17

* Significativo a 5% de probabilidade.

** Significativo a 1% Significativo a 1% no teste.

4.4. Mapeamento de QTL's

Para o mapeamento foi utilizado o método por intervalo composto, de acordo com Zeng (1993, 1994) e Jansen (1993). O método é fundamentado na segregação de marcadores adjacentes ao QTL, com a utilização de marcadores em outros intervalos para controlar o "background genético".

O ponto de corte do QTL foi adotado em função da significância do qui-quadrado, nos níveis de significância de 10%.

Os QTLs encontrados estão relacionados no Quadro 13. Pode-se observar a presença de dois QTLs ambiente não específicos associados ao teor de proteínas nos grupos de ligação C1 e E para os ambientes de Cascavel, 1999 e Viçosa, 1999 (Figuras 1 e 2). O QTL obtido no grupo de ligação C1 explica 7,8% para o ambiente de Cascavel, 1999, e 4,2% para o ambiente de Viçosa, 1999, a variação do teor de proteínas. O QTL obtido no grupo de ligação E explica 7,7% para o ambiente de Cascavel 1999 e 4,2% para o ambiente de Viçosa 1999 a variação do teor de proteínas. Para esta mesma característica foram obtidos também dois QTLs ambientes específicos nos grupos de ligação N e G para os ambiente de Cascavel, 1999 e Viçosa, 1999 (Figura 3 e 4). O QTL do grupo de ligação G explica 3,8% e o QTL do grupo de ligação N explica 3,4% da variação do teor de proteínas.

ORF et al. (1999), obtiveram um QTL associado a teor de proteínas característica no grupo de ligação A1 (denominado de U7 no mapa de Utah) em duas populações provenientes dos cruzamentos entre Minsoy e Archer e Minsoy e Noir, e um QTL no grupo de ligação C1 (U22 no mapa da Universidade de Utah) para o cruzamento entre Minsoy e Archer. Um dos QTL's estáveis identificados por BRUMMER et al. (1997) para a característica teor de proteínas, pertence também ao grupo de ligação E.

Quadro 13 – Intervalos contendo locos controladores das características quantitativas QTLs para proteína (PROT), altura de inserção da primeira vagem (AIPV), dias para maturação (DPM), número de vagens por planta (NVP), número de sementes por planta (NSP), peso de 100 sementes (PCS), altura da primeira vagem (APV) e altura de plantas na maturação (AM), nos ambientes Viçosa e Cascavel, 1999 e Viçosa e São Gotardo, 2000

Característica	Grupo Ligação	Intervalo	Tamanho intervalo (cM)	Posição QTL (cM)	R ²	LR
PROT (Cascavel, 1999)	C1	Satt139/190-Satt399	1,3	12,41	7,8	5,05*
PROT (Viçosa, 1999)	C1	Satt085-Satt139	9,6	12,01	4,2	5,05*
PROT (Cascavel, 1999)	E	Satt384-Sat_112	9,4	0,0	7,7	5,05*
PROT (Viçosa, 1999)	E	Satt384-Sat_112	9,4	0,0	4,2	5,05*
PROT (Cascavel, 1999)	N	Satt549-Sat_091	5,5	0,0	3,4	5,05*
PROT (Viçosa, 1999)	G	Satt012-Satt199	1,9	0,0	3,8	5,05*
AIPV (Viçosa, 2000)	D2	Satt082-Satt528	3,39	19,01	4,3	5,05*
AIPV (Viçosa, 2000)	J	Satt215-Satt183	0,9	4,41	10,4	5,05*
DPM (Viçosa, 1999)	K	Satt441-Satt055	2,4	0,0	5,3	5,05*
DPM (Viçosa, 2000)	K	Satt055-Satt167	2,0	4,41	24,1	5,05*
DPM (Viçosa, 1999)	D2	Satt186-Satt226	15,3	6,01	5,5	5,05*
DPM (Viçosa, 1999)	J	Satt549-Sat_091	5,5	5,01	4,8	5,05*
NVP (Cascavel, 1999)	F	Satt522-Satt144	10,0	10,01	4,2	5,05*
NVP (Cascavel, 1999)	J	Satt215-Satt183	3,5	2,01	5,2	5,05*
NSP (Cascavel, 1999)	F	Satt522-Satt144	10,0	10,01	5,2	5,05*
NSP (Cascavel, 1999)	C1	Satt476-Satt085	2,7	11,01	4,8	5,05*
NSP (Viçosa, 2000)	K	Satt055-Satt167	2,0	4,41	4,2	5,05*
NNM (São Gotardo, 2000)	D2	Satt186-Satt226	0,5	0,0	5,1	5,05*
NNM (Viçosa, 1999)	K	Satt441-Satt055	2,4	2,4	4,7	5,05
NNM (Viçosa, 1999)	D1b+W	Sat_135-Satt350	10,1	0,0	5,5	5,05
PCS (Viçosa, 1999)	C1	Satt476-Sat_085	2,7	11,01	13,3	5,05*
PCS (Viçosa, 1999)	K	Satt441-Satt055	2,4	0,0	5,5	5,05*
PCS (Viçosa, 2000)	K	Satt055-Satt167	0,5	4,41	5,8	5,05*
PCS (São Gotardo, 2000)	G	Satt199-Satt325	54,4	8,26	6,4	5,05*
PCS (Viçosa, 2000)	G	Satt012-Satt199	1,9	0,0	3,8	5,05*
APV (São Gotardo, 2000)	D2	Satt186-Satt226	7,1	22,01	7,9	5,05*
APV (Viçosa, 2000)	D2	Satt186-Satt226	7,1	19,01	6,8	5,05*
APV (Viçosa, 2000)	J	Satt183-Satt529	0,9	4,41	9,3	5,05*
AM (São Gotardo, 2000)	D2	Satt186-Satt226	15,3	3,01	12,3	5,05*
AM (Viçosa, 1999)	D2	Satt082-Satt528	2,2	22,01	4,9	5,05*
AM (Viçosa, 2000)	D2	Satt082-Satt528	2,2	18,01	4,3	5,05*
AM (Cascavel, 1999)	J	Satt215-Satt183	4,4	1,01	4,1	5,05*
AM (Viçosa, 2000)	J	Satt215-Satt183	0,5	4,41	9,3	5,05*
AM (Cascavel, 1999)	G	Satt 325-Satt183	56,3	94,31	45,9	5,05*

* Significativo a 10% de probabilidade no teste de χ^2 , com um grau de liberdade.

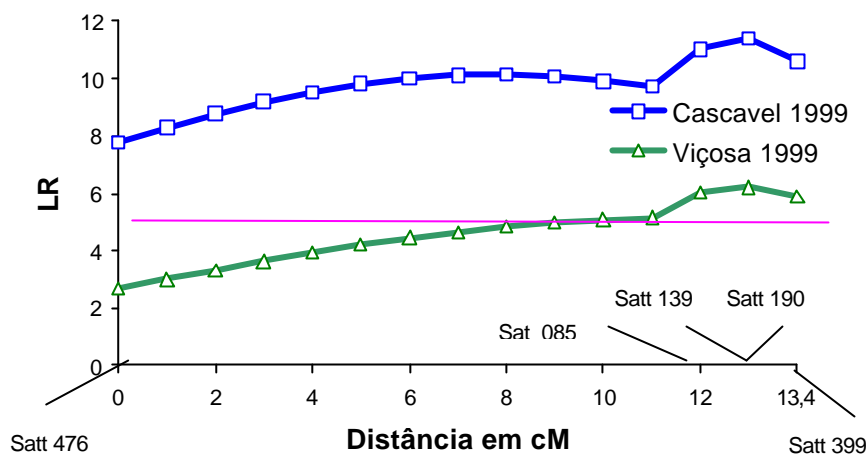


Figura 1 – QTL associado à característica teor de proteína no grupo de ligação C1, encontrado para os ambientes de Cascavel, 1999 e Viçosa, 1999. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

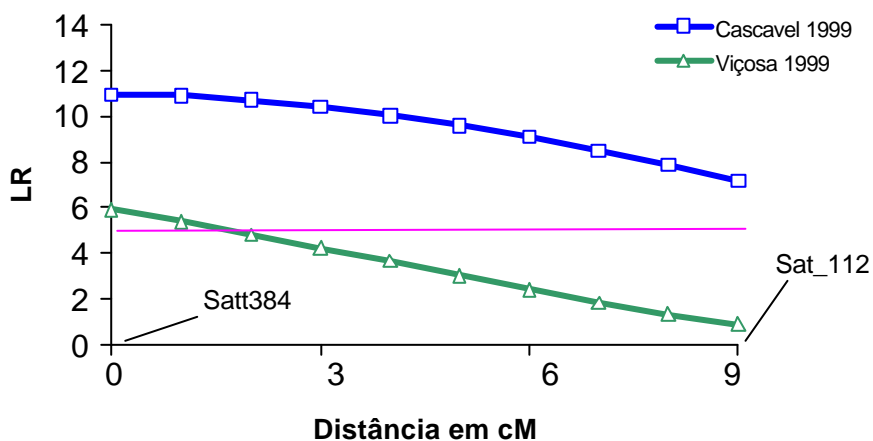


Figura 2 – QTLs associados à característica teor de proteína no grupo de ligação E, encontrado para os ambientes de Cascavel 1999, e Viçosa, 1999. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

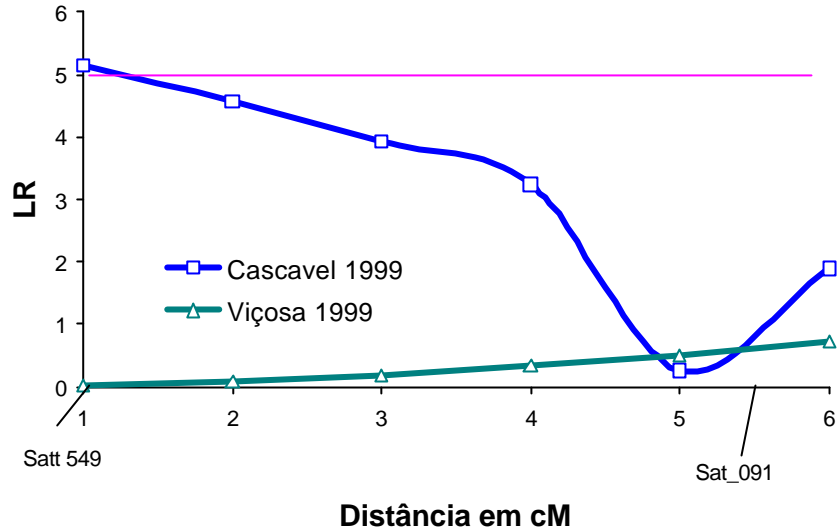


Figura 3 – QTLs associados à característica teor de proteína no grupo de ligação N, encontrado para o ambiente de Cascavel, 1999. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

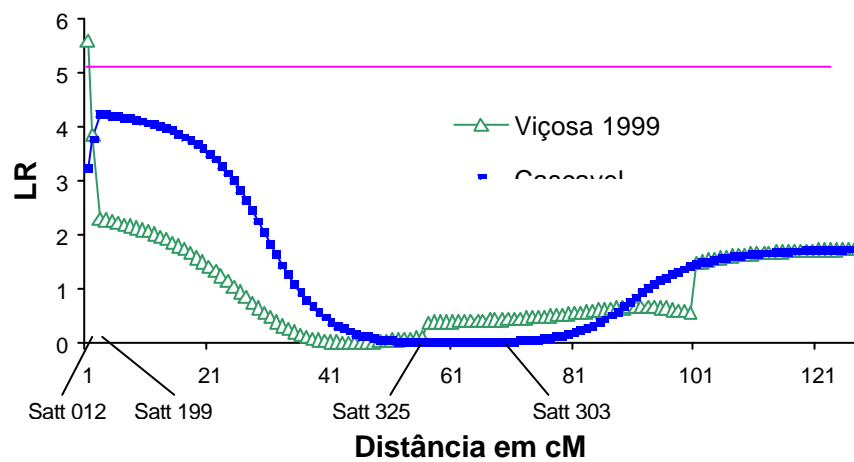


Figura 4 – QTLs associados à característica teor de proteína no grupo de ligação G, encontrado para o ambiente de Viçosa, 1999. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

Para a característica altura da inserção da primeira vagem foram obtidos dois QTLs ambiente específicos no ambientes de São Gotardo 2000 e Viçosa 2000, nos grupos de ligação D2 e J que explicam 4,3 e 10,4% respectivamente a variação da altura da inserção da primeira vagem (Figuras 5 e 6).

Para a característica dias para maturação foi obtido um QTL não específico no grupo de ligação K para os ambientes de Viçosa, 1999 e Viçosa, 2000 (Figura 7). Os QTLs identificados para Viçosa, 1999 e Viçosa, 2000 explicam respectivamente 5,3 % e 24,1% a variação da característica dias para maturação. Foram identificados ainda, para a característica de dias para maturação, 2 QTLs ambientes específicos nos grupos de ligação D2 e J, no ambiente de Viçosa 1999 que explicam 5,5% e 4,8% respectivamente a variação desta característica (Figuras 8 e 9). LEE et al. (1996) com utilização de marcadores RFLP identificaram dois QTLs associados a dias para maturação no grupo de ligação K que explicam 31,2% e 26,2% da variação desta característica.

Foram obtidos dois QTLs ambientes específicos para a característica número de vagens por planta para o ambiente de Cascavel, 1999, nos grupos de ligação F e J, que explicam 4,2% e 5,2% respectivamente a variação desta característica (Figuras 10 e 11).

Para a característica número de sementes por plantas foram obtidos três QTLs ambientes específicos. Dois QTLs foram obtidos no ambiente de Cascavel 1999 nos grupos de ligação F e C1, que explicam 5,2% e 4,8% respectivamente a variação desta característica (Figuras 12 e 13). O terceiro QTL para número de sementes por planta foi identificado para o ambiente de Viçosa, 2000, no grupo de ligação K e explica 4,2% da variação do número de sementes por planta (Figura 14). ORF et al. (1999) identificaram QTLs associados a esta característica nos grupos de ligação A2, B1, C2, M e F (grupos U3, U4, U9, U11 e U13 no mapa da Universidade de Utah) em populações provenientes dos cruzamentos entre Minsoy e Archer, Minsoy e Noir e Archer. Podemos observar um comportamento semelhante dos QTLs obtidos para os grupos de ligação F, para as características número de vagens por planta e número de sementes por planta (Figuras 10 e 12). É

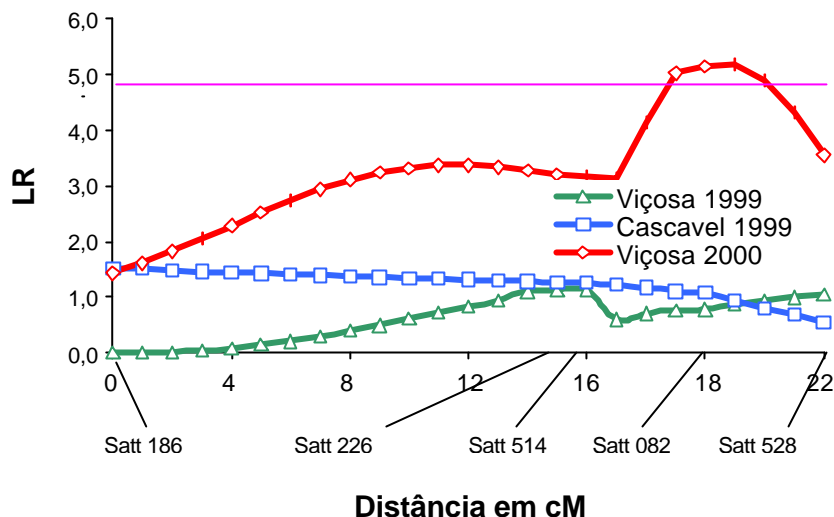


Figura 5 – QTL associado à característica altura da inserção da primeira vagem no grupo de ligação D2, encontrado para o experimento de Viçosa, 2000. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

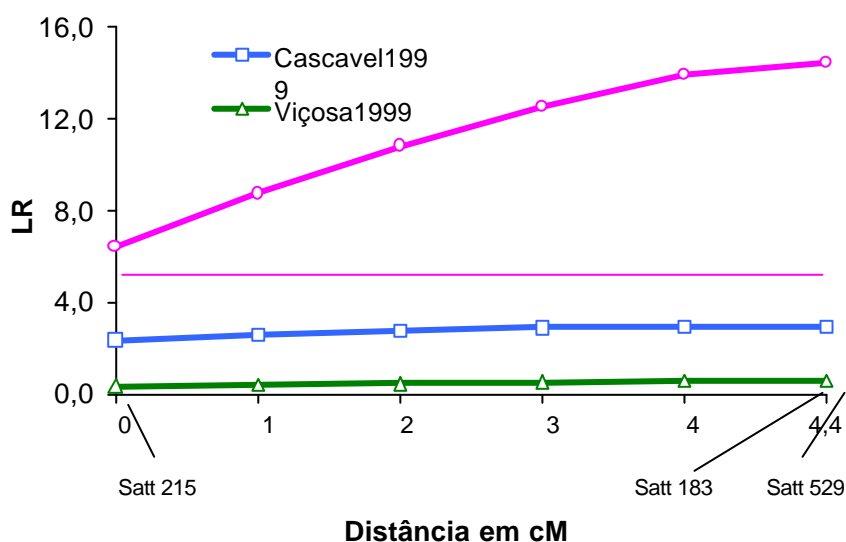


Figura 6 – QTL associado à característica altura da inserção da primeira vagem no grupo de ligação J, encontrado para o experimento de Viçosa, 2000. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

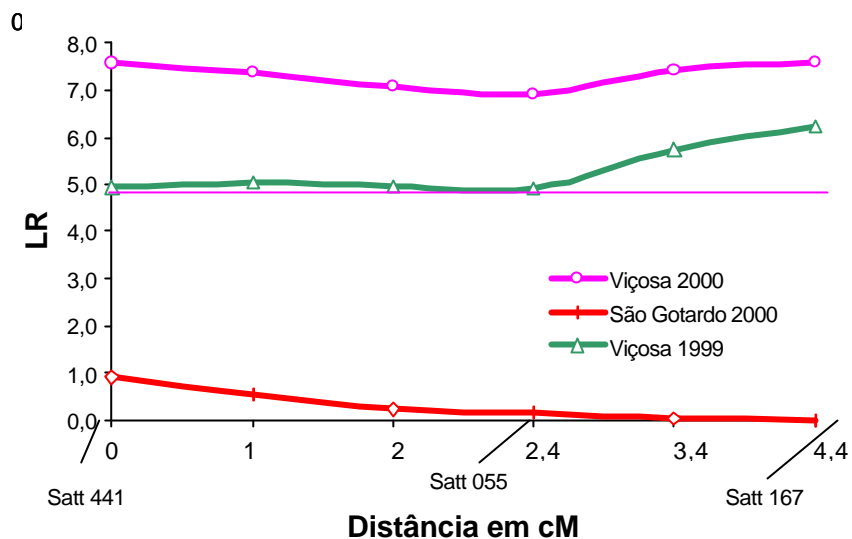


Figura 7 – QTLs associados à característica dias para maturação no grupo de ligação K, encontrado para os ambientes de Viçosa, 1999 e Viçosa, 2000. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

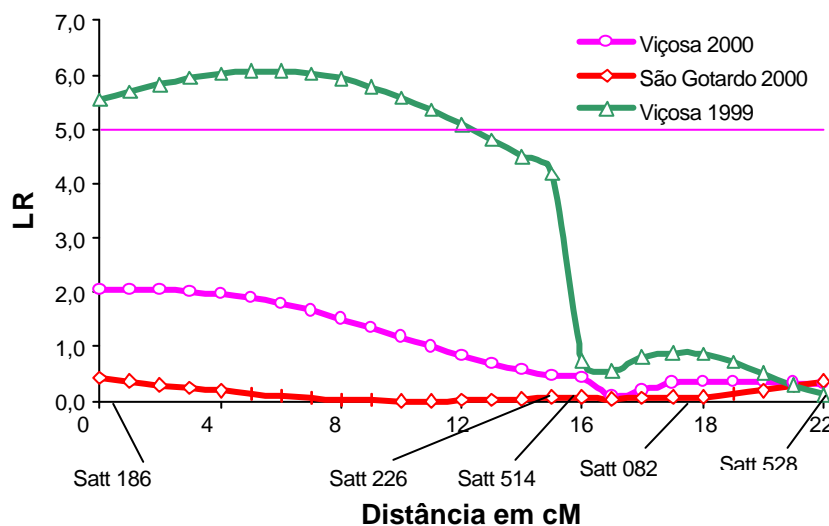


Figura 8 – QTLs associados à característica dias para maturação no grupo de ligação D2, encontrado para o ambiente de Viçosa, 1999. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

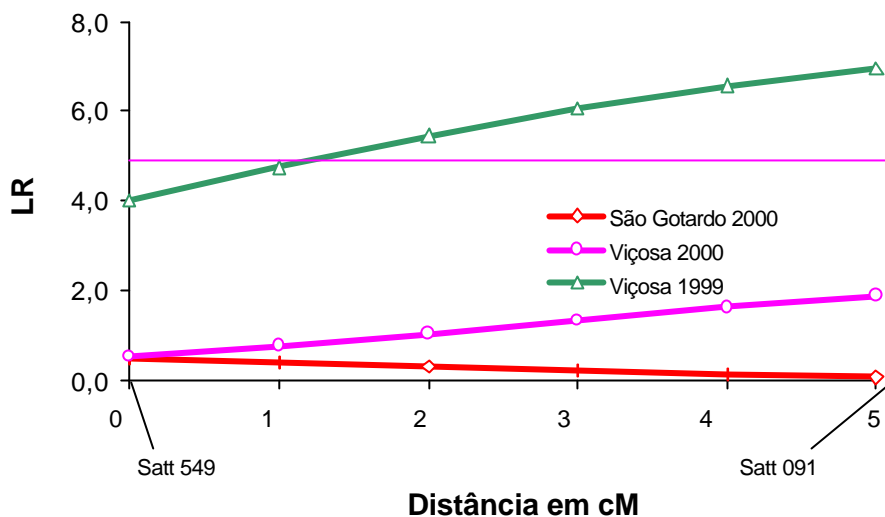


Figura 9 – QTLs associados à característica dias para maturação no grupo de ligação J, encontrado para o ambiente de Viçosa, 1999. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

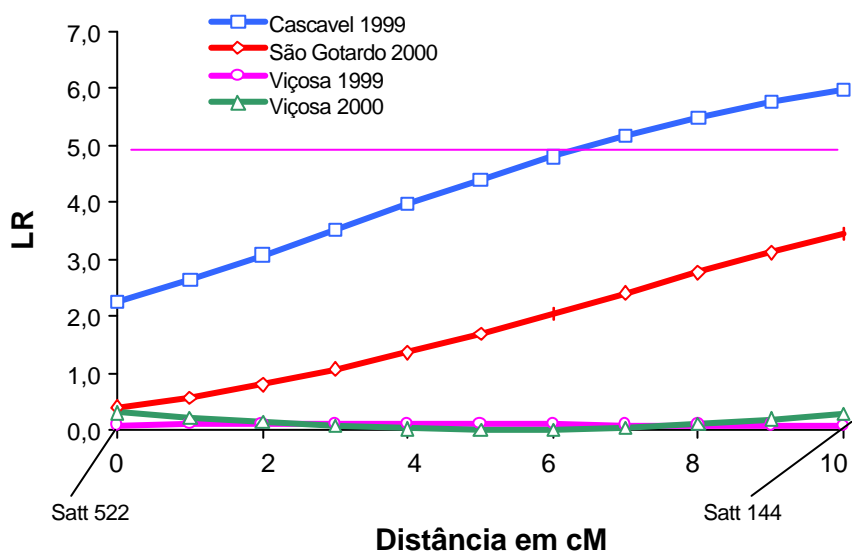


Figura 10 – QTLs associados à característica números de vagens por planta no grupo de ligação F, encontrado para o ambiente de Cascavel, 1999. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

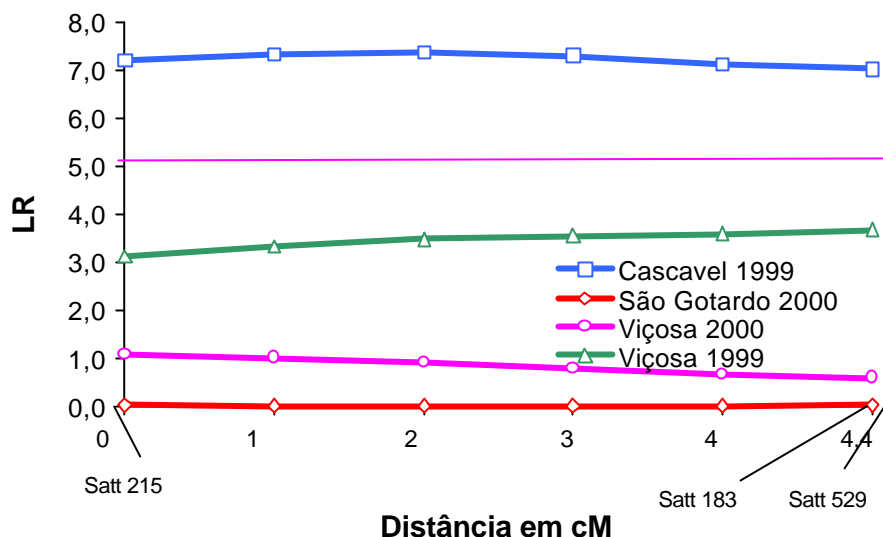


Figura 11 – QTLs associados à característica número de vagens por planta no grupo de ligação J encontrado para o ambiente de Cascavel, 1999. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

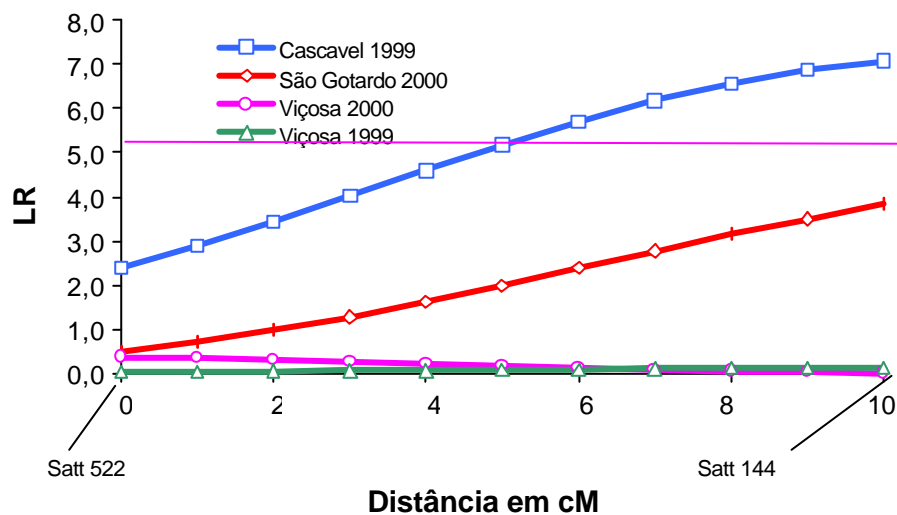


Figura 12 – QTLs associados à característica número de sementes por planta no grupo de ligação F encontrado para o ambiente de Cascavel, 1999. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

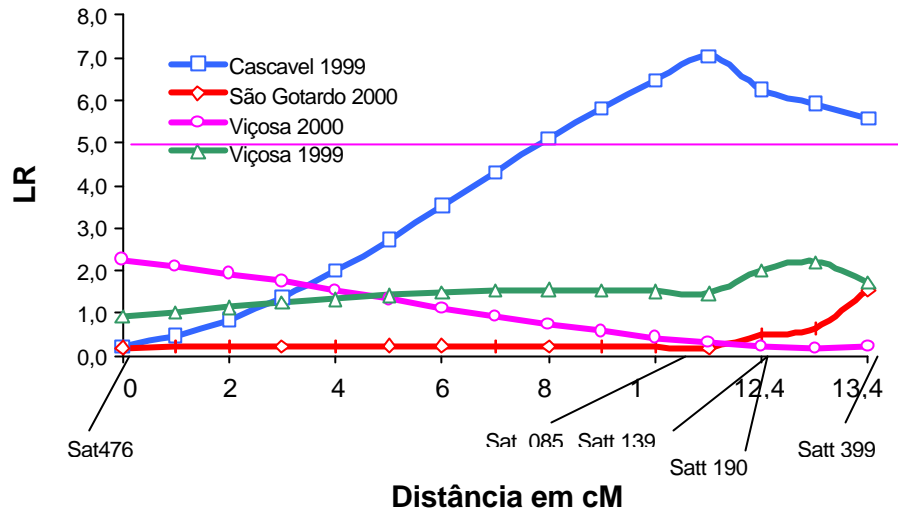


Figura 13 – QTLs associados à característica número de sementes por planta no grupo de ligação C1 encontrado para o ambiente de Cascavel, 1999. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

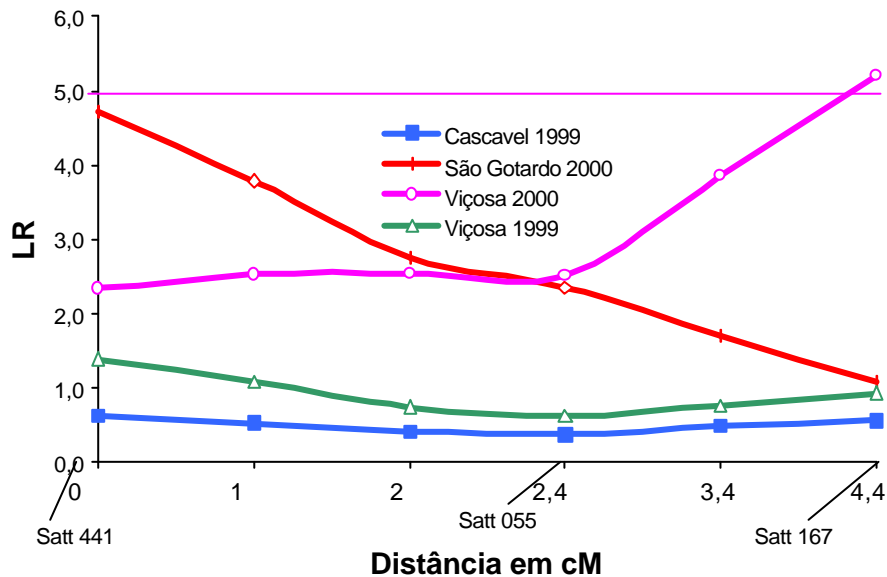


Figura 14 – QTLs associados à característica número de sementes por planta no grupo de ligação K encontrado para o ambiente de Viçosa, 2000. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

um resultado esperado visto que existe uma associação entre o número de vagens e o número de sementes por planta.

Na característica número de nós na maturação foi identificado um QTL ambiente não específico no grupo de ligação D2 para o ambiente de São Gotardo, 2000. O QTL obtido explica respectivamente para este ambiente 5,1% a variação desta característica (Figura 15). Dois outros QTLs ambiente específicos foram identificados para número de nós na maturação nos grupos de ligação K e D1b+W (no ambiente de Viçosa, 1999). Estes QTLs explicam 4,7% e 5,5% respectivamente variação da característica considerada (Figuras 16 e 17). Para a característica peso de cem sementes foi obtido um QTL ambiente específico nos grupos de ligação C1 nos ambiente de Viçosa, 1999 que explica 13,3% a variação desta característica (Figuras 18). Foram identificados dois QTLs ambiente não específicos nos grupos de ligação K (Viçosa 1999 e Viçosa, 2000) e G (São Gotardo, 2000 e Viçosa, 2000). No grupo de ligação K o QTL obtido explica 5,5% e 5,8% a variação do peso de cem sementes nos ambientes de Viçosa 1999 e Viçosa 2000 respectivamente. No grupo de ligação G o QTL obtido explica 6,4% e 3,8% a variação do peso de cem sementes nos ambientes de São Gotardo, 2000 e Viçosa, 2000, respectivamente. Para produção de sementes (Kg/ha), ORF et al. (1999) identificaram QTLs associados a esta característica nos grupos de ligação C2, M, D2, L e D1b (grupos U9, U11, U12, U14 e U19 no mapa da Universidade de Utah).

Para a característica altura da primeira vagem foi obtido um QTL ambiente não específicos no grupo de ligação D2 para os ambientes de São Gotardo 2000 e Viçosa 2000. Esses QTLs explicam a variação desta característica em 7,9% e 6,8% (Figura 21). Para o ambiente de Viçosa, 2000, foi identificado um QTL ambiente específico no grupo de ligação J que explica 9,3% da característica altura da primeira vagem neste ambiente (Figura 22).

Na característica de altura das plantas de soja na maturação no grupo de ligação D2 foi obtido dois QTLs ambiente não específico e um QTL ambiente específico (Figuras 23 a 25). Para os ambientes de São Gotardo, Viçosa, 1999 e Viçosa, 2000 foi obtido um QTL ambiente não específico no grupo de ligação D2, que explica 12,3%, 4,9% e 4,3% respectivamente a

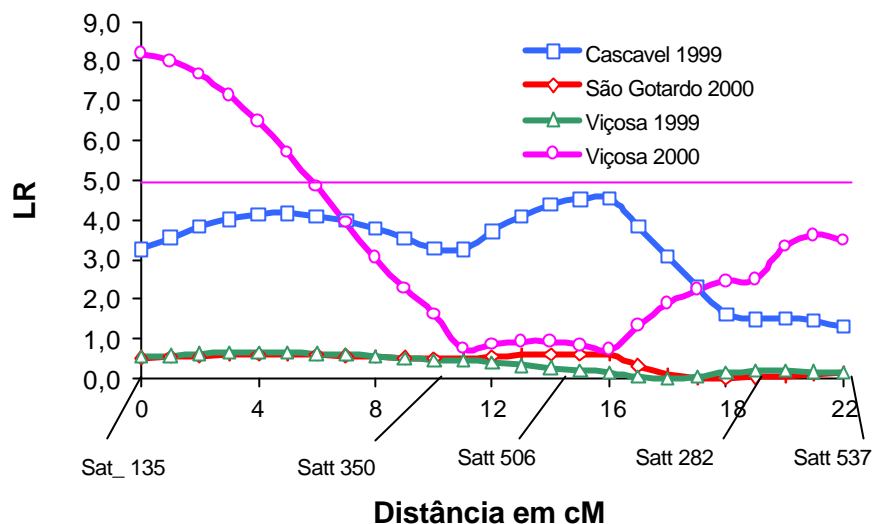


Figura 17 – QTLs associados à característica número de nós na maturação no grupo de ligação D1b+W encontrado para o ambiente de Viçosa, 1999. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

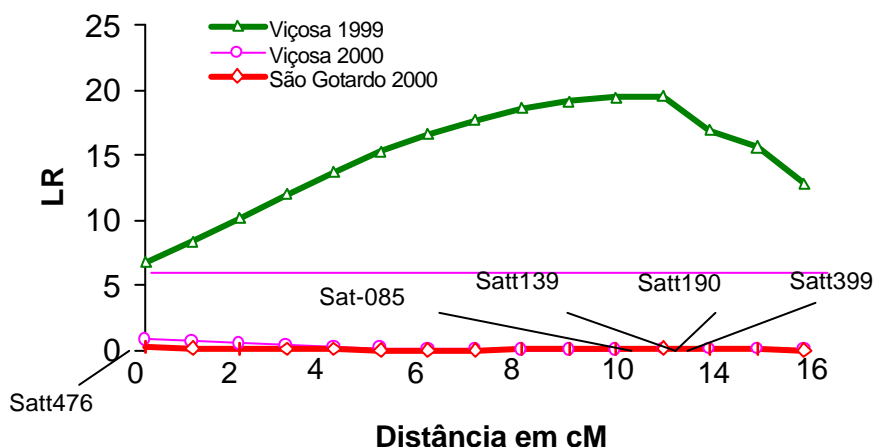


Figura 18 – QTL associado à característica peso de 100 sementes no grupo de ligação C1, no ambiente de Viçosa, 1999. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

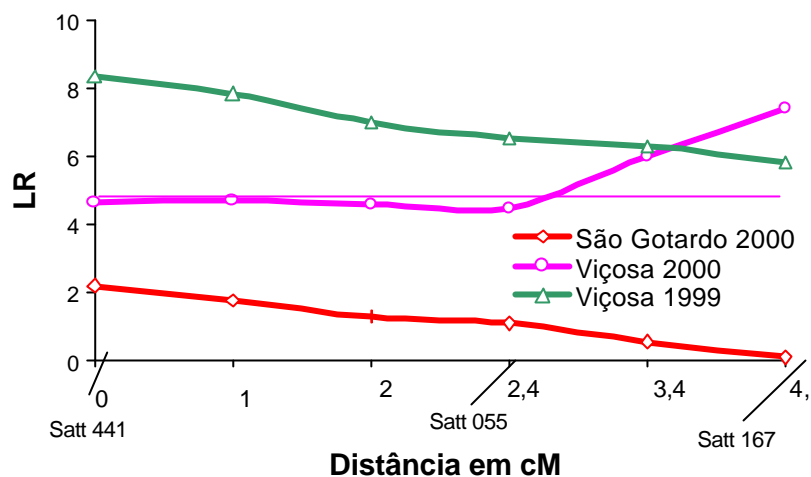


Figura 19 – QTL associado à característica peso de 100 sementes no grupo de ligação K, no ambiente de Viçosa, 1999 e Viçosa, 2000. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

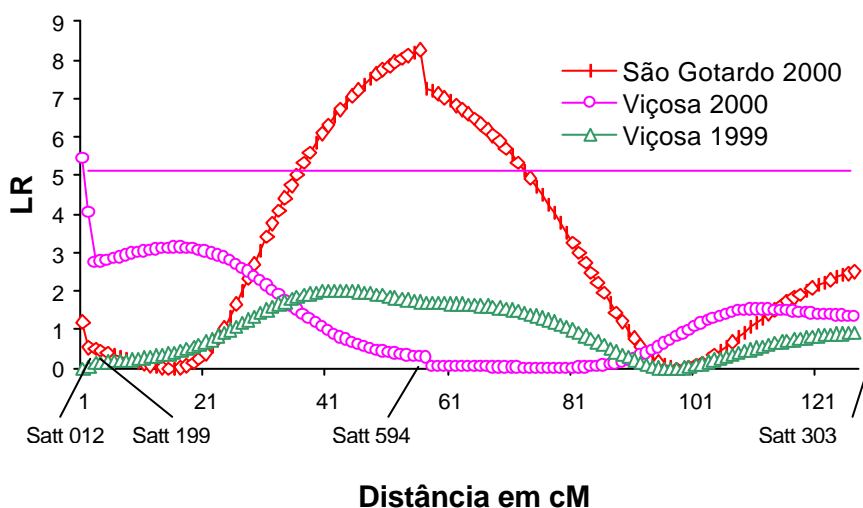


Figura 20 – QTL associado à característica peso de 100 sementes no grupo de ligação G, nos ambientes de São Gotardo, 2000 e Viçosa, 2000. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

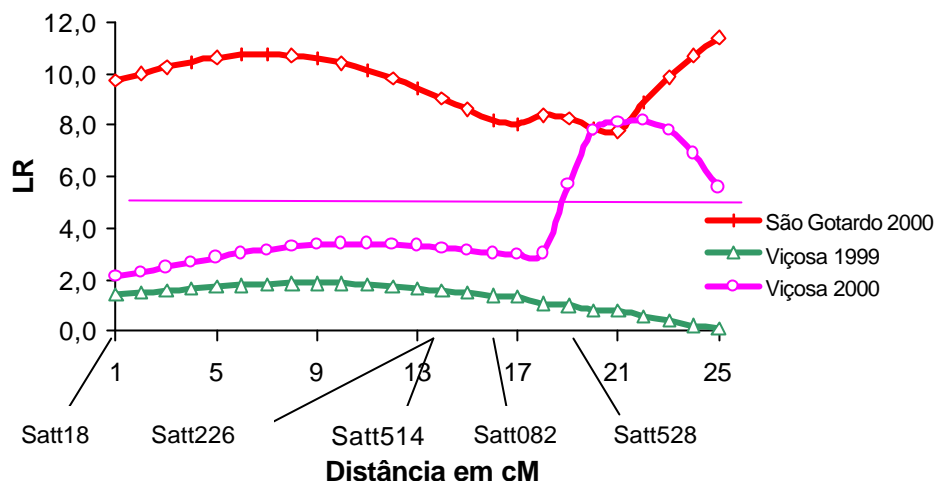


Figura 21 – QTL associado à característica altura da primeira vagem no grupo de ligação D2, encontrado para o ambiente de São Gotardo, 2000 e Viçosa, 2000. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

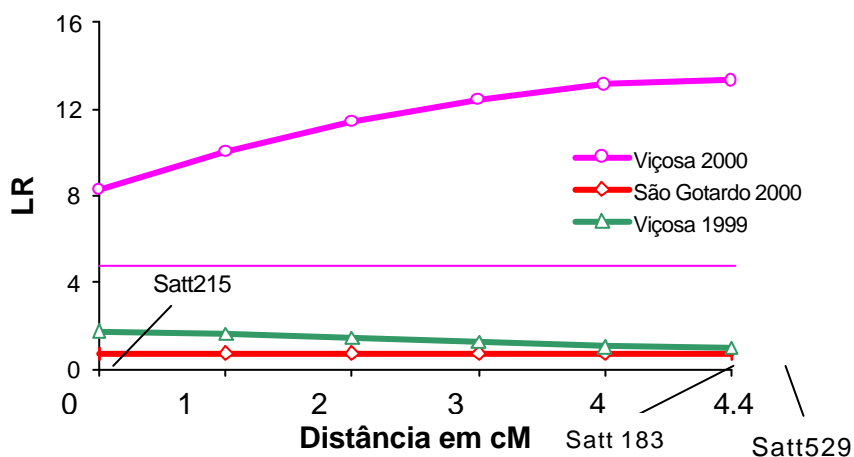


Figura 22 – QTL associado à característica altura da primeira vagem no grupo de ligação J, encontrado para o ambiente de Viçosa, 2000. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

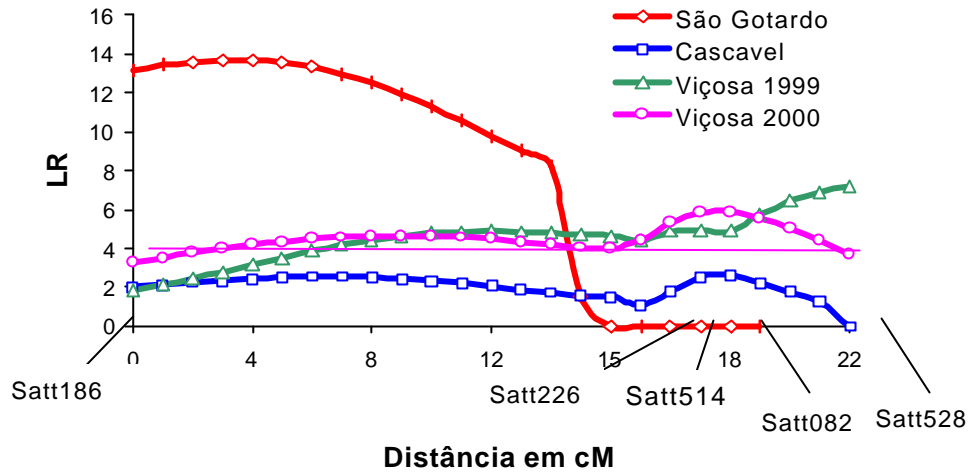


Figura 23 – QTL associado à característica altura de plantas na maturação, no grupo de ligação D2, encontrado para o ambiente de São Gotardo, 2000, Viçosa, 1999 e Viçosa, 2000. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

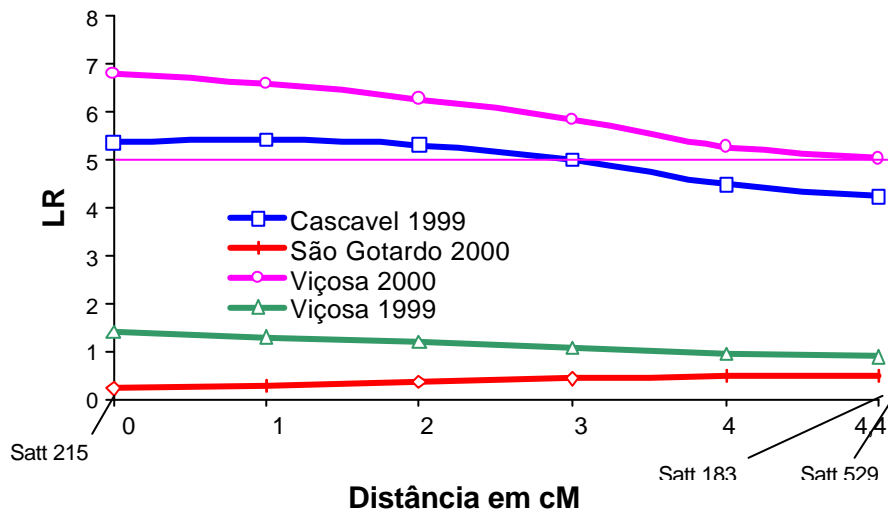


Figura 24 – QTL associado à característica altura de plantas na maturação, no grupo de ligação J, encontrado para os ambiente de Viçosa 2000, e Cascavel, 1999. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

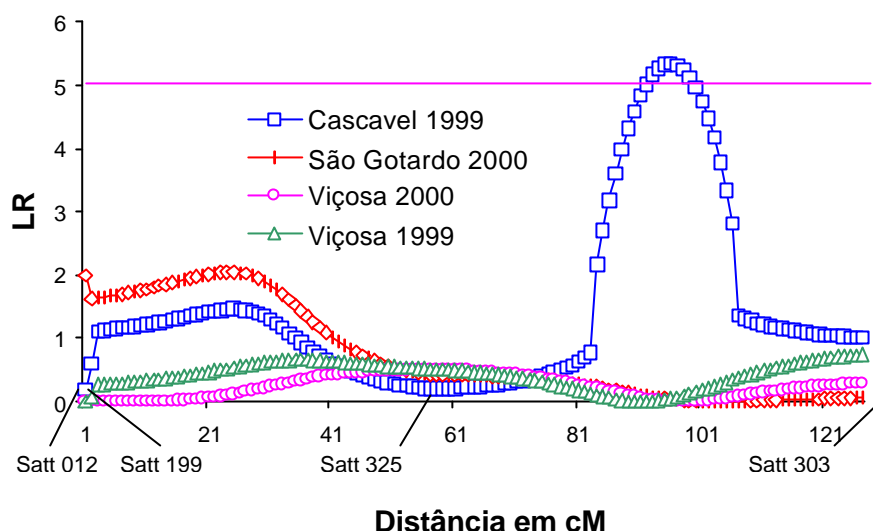


Figura 25 – QTL associado à característica altura de plantas na maturação, no grupo de ligação G, encontrado para os ambientes de Cascavel, 1999. Foi utilizado um nível de significância de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo.

variação da característica nestes ambientes. No grupo de ligação J foi obtido um QTL ambiente não específico para os ambientes de Cascavel, 1999 e Viçosa, 2000 que explica 4,1% e 9,3% respectivamente a variação da característica altura de plantas na maturação. Foi identificado também um QTL ambiente específico para o ambiente de Cascavel, 1999 que explica 45,9% a variação da característica. LEE et al. (1996) com utilização de marcadores RFLP identificaram QTL associado com altura de plantas em soja no grupo de ligação L que explica 67,7% a variação da altura de plantas. Foram identificados também por estes autores, QTLs para altura de plantas nos grupos de ligação H e N que explicam 8,2% e 9,4% respectivamente a variação desta característica. Com a utilização de marcadores RFLP, LEE et al. (1995) identificaram QTLs associados à característica altura de plantas no grupo de ligação L. ORF et al. (1999) identificaram QTLs associados a esta característica nos grupos de ligação C2, M, F, L e D1b (U9, U11, U13, U14 e U19 no mapa da Universidade de Utah).

Os *primers* pertencentes aos grupos de ligação em que foram obtidos QTLs significativos, coincidem com os *primers* presentes nos grupos de ligação em mapa integrado desenvolvido por CREGAN et al. (1999), em que foram utilizados três mapas diferentes: USDA/Iowa State (*G. max* x *G. soja*), Univ. de Utah (Minsoy x Noir), e da Univ. de Nebraska (Clark x Harosoy). Este mapa integrado foi definido com a utilização de marcadores SSR, RFLP, RAPD, AFLP, isoenzimas e marcadores clássicos, com um total de 1.423 marcadores. Foram definidos 20 grupos de ligação consenso.

O método de mapeamento por intervalo composto (ZENG, 1993 e 1994, JANSEN, 1993) tem grande poder de detecção de QTLs e de melhorar a precisão das estimativas do efeito e da posição dos mesmos. Este método é baseado na segregação de marcadores adjacentes ao QTL, utilizando marcadores em outros intervalos para controlar o background genético, ou seja, isolar o efeito de outros possíveis QTLs que estejam ligados. Pelo grande número de permutações necessárias para obter o valor do ponto de corte, e pelo fato de ter que ser repetido a cada experimento ou modelo testado, esta estratégia é computacionalmente muito lenta. Como a razão de verossimilhança possui uma relação com o qui-quadrado, o ponto de corte foi adotado em função da significância do qui-quadrado, a nível de 10% para o mapa completo, que resulta em 0,00588% para cada cromossomo. Os valores do ponto de corte foram similares aos obtidos pelo teste de permutação em um teste preliminar, com utilização de somente alguns grupos de ligação.

Os resultados apresentados referem-se somente a QTLs obtidos com a utilização de marcadores moleculares SSR ou microssatélites. No mapeamento do genoma de uma espécie tem sido utilizado a integração de diversos marcadores, incluindo morfológicos, isoenzimáticos, RAPD, RFLP, AFLP e microssatélites. A inclusão de outros tipos de marcadores neste mapa deve ser realizada em trabalhos de pesquisa futuros para melhorar a estimativa dos QTLs associados às características avaliadas.

A presença de QTLs estáveis (expressos em vários ambientes), é muito útil na seleção assistida em programas de melhoramento. Neste trabalho foram obtidos QTLs ambientes específicos e ambiente não

específicos, entretanto, devem ser desenvolvidos trabalhos com outros marcadores para aumentar a saturação do mapa.

Observa-se, para algumas características, que o comportamento da curva de verossimilhança é idêntico em mais de um ambiente, mas a magnitude é diferente, o que faz com que um QTL seja significativo em um ambiente, e não em outro. Um exemplo típico deste comportamento está nas Figuras 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16 19, 23, 24. A falta de significância em um local pode ser devido a menor precisão experimental, ou ao menor efeito do QTL, que pela pouca saturação do mapa de ligação não pôde ser declarado significativo.

O aumento na saturação do mapa deve melhorar a precisão do mapeamento de QTLs tanto pela melhor caracterização da região do QTL, com vários marcadores no grupo de ligação mais proximamente ligados, quanto pela presença de marcadores associados a outros QTLs para a mesma característica, que podem ser usados como co-fatores no mapeamento de intervalos composto.

A presença de outros QTLs, sem que marcadores ligados sejam identificados e usados como co-fatores na estimativa de parâmetros de uma região do mapa, diminui a precisão da estimativa, pois o efeito deste QTL não marcado vai para o resíduo.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho foi realizado em campo experimental, em laboratório de análises de sementes do departamento de Fitotecnia e laboratórios do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), na Universidade Federal de Viçosa. O objetivo foi identificar marcadores do tipo microssatélites ligados a QTL's que controlam as características dias para maturação, altura de planta na maturação, número de nós na maturação, número de vagens por planta, altura da primeira vagem, altura de inserção da primeira vagem, número de sementes por planta, peso de sementes por planta, peso de 100 sementes e teor de proteína. Foram utilizados 118 RIL's (Linhagens recombinantes endogâmicas), que se encontravam nas gerações F_6 e F_7 . As RIL's foram obtidas por meio do cruzamento entre dois genótipos contrastantes: BARC-8 e Garimpo. Estas variedades são contrastantes para as características agrônômicas altura da planta na maturação, altura da inserção da primeira vagem, altura da primeira vagem, número de nós na maturação, número de vagens por planta, número de sementes por planta, peso de sementes por planta, peso de 100 sementes, número de dias para maturação e teor de proteínas. BARC-8 é um genótipo com alto teor de proteína (em torno de 50%) e a variedade Garimpo é um genótipo com teor normal de proteínas (em torno de 36%). As RIL's foram cultivadas em quatro ambientes: Viçosa-MG, 1999;

Cascavel-PR, 1999; Viçosa-MG, 2000 e São Gotardo-MG, 2000. O mapeamento genético foi realizado por meio de marcadores microssatélites.

Os resultados obtidos permitiram algumas conclusões:

1. Interação genótipo x ambiente só não foi significativa para peso de 100 sementes e número de dias para maturação tanto para testemunhas quanto para famílias, mostrando que fatores ambientais estão envolvidos na regulação da expressão de genes para a maioria das características.

2. Muitos dos marcadores associados às características estudadas foram diferentes de um local para o outro, o que sugere uma interação entre o genótipo e o ambiente.

3. Com a utilização de nível de significância de 10% para o mapa, foram encontrados os seguintes QTLs:

- Dois QTLs ambientes não específicos nos grupos de ligação C1 e E e dois QTLs ambiente específicos nos grupos de ligação N e G associados à característica teor de proteína.

- Dois QTLs ambientes específicos nos grupos de ligação D2 e J associados à característica altura de inserção da primeira vagem.

- Um QTL ambiente não específico nos grupos de ligação K e dois QTLs ambientes específicos nos grupos de ligação D2 e J, associados à característica dias para maturação.

- Dois QTLs ambientes específicos nos grupos de ligação F e J associados à característica número de vagens por planta.

- Três QTLs ambientes específicos nos grupos de ligação F, C1 e K associados à característica número de sementes por planta.

- Três QTLs ambiente específicos nos grupos de ligação D2, K e D1b+W associados à característica número de nós na maturação.

- Um QTL ambiente específico no grupo de ligação C1 e dois QTLs ambiente não específicos nos grupos de ligação K e G associados à característica peso de cem sementes.

- Um QTL ambiente não específico nos grupo de ligação D2 e um QTL ambiente específico nos grupo de ligação J, associados à característica altura da primeira vagem.

- Dois QTLs ambientes não específicos nos grupo de ligação D2 e J e um QTL ambiente específico no grupo de ligação G, associados à característica altura de plantas na maturação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R.V., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germoplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree data. **Rev. Bras. Genet.**, v.18, p.265-273, 1995.
- BASTEN, C.J. WEIR, B.S., ZENG, Z.B., Zmap a QTL cartographer. In: Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production: Computing, Strategies and Software. SMITH, C., GAVORA, B., BENKEL, J., CHESNAIS, FAIRFULL, W., GIBSON, J.P., KENNEDY, B.W., BURNSIDE, E.B., v.22, p.65-66. 5th World congress on Genetics applied to livestock production, Guelp, Ontario, Canada. 1994.
- BASTEN, C.J., WEIR, B.S., ZENG, Z.B. **QTL Cartographer**, Version 1.13. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC, 1999.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.**, v.32, p.314-331. 1980.
- BRUMMER, E.C., GRAEF, G.L., ORF, J. WILCOX, J.R., SHOEMAKER, R.C. Mapping QTL for seed protein and oil content in eight soybean populations. **Crop. Sci.** v.37, n.1, p.373-378. 1997.
- CHAPARRO, J.X., WERNER, D.J., D`MARLLEY, D., SEDEROFF, R.R. Targeted mapping and linkage analysis of morphological, isozyme, and RAPD markers in peach. **Theor. Appl. Genet.**, v.87, p.801-815, 1994.

- CREGAN, P.B., JARVIK, T., BUSH, R.C., SHOEMAKER, R.C., LARK, K.G., KAHLER, A.L., KAYA, N., VANTOAI, T.T., LOHNES, D.J., CHUNG, J., SPEXHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop. Sci.**, v.39, n. 5, p.1464-1490, 1999.
- CRUZ, C.D., SHUSTER, I. **Programa GQmol**. Encontrado em: <http://ufv.br/dbf/gqmol/gqmol.htm>.
- DEORGE, R.W., CHURCHIL, G.A. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. **Genetics**, v.142, n.1, p.285-294.
- DIERS, B.W., BEILINSON, V., NIELSEN, N.C., SHOEMAKER, R.C. Genetic mapping of the *Gy4* e *Gy5* glycinin genes in soybean and the analysis of a variant of *Gy4*. **Theor. Appl. Genet.** V. 89, p. 297-304, 1994.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p. 13- 15,1990.
- FERREIRA, M.E., GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 2 ed., Brasília, embrapa – cenargen, 1996. 220p.
- GELDERMANN, H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. **Theor. Appl. Genet.**, v.46, p. 319-330. 1975.
- GIZLICE, Z. CARTER, JR., URTON, J.W. Genetic diversity in North American soybean: I. Multivariate analysis of founding stock and relation to coefficient of parentage. **Crop Sci.**, v.33, p.614-620, 1993.
- HANSON, S.W., WEBER, C.R. Analysis of genetic variability from generations of plant-progeny lines in soybeans. **Crop. Sci.**, v.2, p. 63-67, 1962.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz; métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed., São Paulo: 1985. v.1, 533p.
- JANSEN, R.C., Maximum likelihood in a generalized linear finite mixture model by using the EM algorithm. **Biometrics**, v. 49, p.227-231, 1993.
- JOHNSON, H.W., BERNARD, R.L. Soybean genetics and breeding. In: Norman, a.g., (ed.) **The soybean**. Academy press, New York, p. 1-73, 1963.
- KEIM, P., SHOEMAKER, R.C., PALMER, R.G. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. **Theor. Appl. Genet.**, v.77, p.786-792. 1989.

- KEIM, P., SCHUPP, J.M., TRAVIS, S.E., CLAYTON, K., FERREIRA, A.A., Web, D.M. A high-density soybean genetic map based upon AFLP markers. **Crop. Sci.** v.37, p.537-543, 1997.
- LANDER, E.S., GREEN, P. ABRAHAMSON, J. BARLOW, A., DALY, M.J., LINCOLN, S.E., NEWBURG, L. Mapmaker: a interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics.** V.1, p.174-181, 1987.
- LEE, S.H., BAILEY, M.A., MIAN, M.A.R., SHIPE, E.R., ASHLEY, D.A., PARROT, W.A., HUSSEY, R.S., BOERMA, H.R. Identification of quantitative trait loci for plant height, lodging and maturity in a soybean population segregating for growth habit. **Theor. Appl. Genet.**, v.92, p.516-523, 1996.
- LINCOLN, S., DALY, M., LADER, E. Constructing genetic maps MAPMAKER/EXP 3.0 3. eds. **Whitehead Institute, Technical report**, 1992a.
- LITT, M., LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v.44, p.937-1401. 1989.
- LIU, B-H., KNAPP, S.J.G. Mendel: a program for Mendelian segregation and linkage analysis of individual or multiple progeny populations using log-likelihood ratios. **J. Hered.**, v.81, p.407-410. 1992.
- MAUGHAN, P.J., SAGHAI MAROOF, M.A., BUSS, G.R., HUESTIS, G.M. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance and near isogenic line analysis. **Theor. Appl. Genet.**, v.93, p.392-401, 1996.
- MORGANTE, M., RAFALSKI, A., BIDDLE, P. TINGEY, S., OLIVIERI, A.M. Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. **Genome**, v.37, p.763-769, 1994.
- ORF, J.H., CHASE, K., MANSUR, L.M., CREGAM, P.B., ADLER, F.R., LARK, K.G. Genetic of soybean agronomic traits: I. Comparison of three related recombinant imbred populations. **Crop. Sci.**, v. 39, p. 1642-1651, 1999.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2. ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, v.3, p.8B.
- SHOEMAKER, R.C., GUFFY, R.D., LORENZEN, L.L., SPECHT, J.E. Molecular genetic mapping of soybean: map utilization. **Crop. Sci.**, v.32, p.1091-1098, 1992.

- SHOEMAKER, R.C. RFLP map of soybean. In: PHILLIPS, R.L. & VASIL, I.K., eds. **DNA- based markers in plants**. s. 1, Kluwer Academic Publishers, 1994. p.290-309.
- SHUSTER, I. ABDELNOOR, R., MARIN, S.R.R., CARVALHO, V.P., KIIHL, R.A.S., SILVA, J.F.V., SEIDYAMA, C.S., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identification of a new major QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*heterodera glycyces*). **Theor. Appl. Genet.** v. 102, p.91-96, 2001.
- SMITH, J.D., KINMAN, M.L. The use of parent-offspring regression as an estimator of heritability. **Crop Sci**, v.5, p.595-596, 1965.
- STAM, P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. **Plant J.**, v.3, p.739-744, 1993.
- TINGEY, S.V., RAFALSAKI, J.A., WILLIAMS, G.K. Soybean genome analysis: DNA polymorphism are identified by oligonucleotide primers of arbitrary sequence. In: HERMANN, R.G. & LARKINS, B.A. (Ed.) **Plant Molecular Biology 2**. New York, Plenum Press, 1991. p.263-8.
- TINGEY, S.V., DEL TUFO, J.P. Genetic analysis with Random Amplified Polymorphic DNA Markers. **Plant physiol.**, v.101, p.349-352, 1993.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, T.V., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.**, v.23, p.4407- 4414, 1995.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A., LIVAK, K.J., RAFALSK, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p.6531-6535, 1990.
- XIAO, J., LI, J., YUAN, L., TANKSLEY, S.D. Identification of QTLs affecting traits of agronomic importance in a recombinant inbred population derived from a subspecific rice cross. **Theor. Appl. Genet.** v.92, p.230-244, 1996.
- ZENG, Z.B. Theoretical basis for separation of multiple linked genes effects in mapping quantitative trait loci. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p.10972-10976, 1993.
- ZENG, Z.B. Precision mapping quantitative trait loci. **Genetics**, v.136, n.9, p.1457-1468, 1994.

CAPITULO 2

LIPOXIGENASES, TEOR DE ÁCIDO LINOLÊNICO E QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE SOJA

1. INTRODUÇÃO

Lipoxigenases (E.C. 1.13.11.12) são enzimas que catalisam a adição de oxigênio molecular a ácidos graxos polinsaturados contendo o sistema cis, cis - 1,4 - pentadieno (AXELROD et al, 1981; MACK et al., 1987). As lipoxigenases (LOX) estão presentes nas sementes de soja na forma de três isoenzimas LOX1, 2 e 3. Os alelos que determinam a ausência dessas isoenzimas em sementes de soja são recessivos e possuem herança mendeliana simples. O loco L1 está ligado ao L2 e o loco L3 é independente (KITAMURA et al., 1983).

Na fração óleo de sementes de soja, o ácido linoléico representa em torno de 57%, enquanto que o ácido linolênico corresponde de 7 a 9% (KITAMURA et al., 1984). Os ácidos linoléico e linolênico destacam-se como os mais susceptíveis à degradação oxidativa enzimática e não enzimática (ANDERSON e BAKER, 1983). A hidroperoxidação dos ácidos graxos polinsaturados pela ação de lipoxigenases leva à produção de hidroperóxidos do ácido graxo, que por reações subseqüentes produzem aldeídos e cetonas de cadeia curta (LAKOKI et al., 1976; AXELROD et al., 1981; GERMAN e KINSELLA, 1985).

WILSON JR. e McDONALD JR. (1986) propuseram um modelo no qual consideram que a peroxidação de lipídios e a conseqüente formação de produtos secundários estão relacionadas com a deterioração das sementes. As sementes armazenadas e com grande reserva de lipídios estão sujeitas a um lento e consistente ataque por oxigênio, formando hidroperóxidos, outros ácidos oxigenados e radicais livres.

NEFF et al. (1992) obtiveram correlação positiva entre o número de duplas ligações do ácido graxo (linoléico e linolênico) com a formação de peróxidos. TRAWATHA et al. (1995b e 1995b) observaram correlação negativa entre teores de ácido linolênico com a qualidade fisiológica de sementes de soja. Foi observada também baixa associação entre atividade de lipoxigenases com a qualidade fisiológica das sementes.

Os trabalhos desenvolvidos no BIOAGRO têm sido realizados com o objetivo de determinar os efeitos da enzima lipoxigenase na qualidade de sementes de soja (QUEIRÓZ, 1993; OLIVEIRA, 1996; DIAS, 1999; QUEIRÓZ, 2000). No entanto, teores de ácidos graxos da fração óleo das sementes não têm sido considerados nestas avaliações. O objetivo deste trabalho foi determinar a influência da presença das isoenzimas lipoxigenases e do teor de ácido linolênico da fração óleo na qualidade de sementes de soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Qualidade fisiológica das sementes

A semente, após atingir o nível máximo de qualidade, sofre o processo de deterioração, que se refere ao conjunto de transformações degenerativas e irreversíveis que levam finalmente à morte (ABDUL-BAKI e ANDERSON, 1972).

É relativamente difícil produzir sementes de soja de alta qualidade nas regiões tropicais e subtropicais onde, normalmente, ocorre clima quente e úmido no verão. Tais condições aceleram a deterioração da semente no campo, em especial quando a colheita é retardada (CERQUEIRA e POPINIGIS, 1981).

O intervalo entre a maturidade fisiológica e a colheita é como um período de armazenamento no campo em que a ocorrência de chuvas e as condições oscilantes de temperatura e umidade do ar causam o intumescimento diferenciado dos tecidos externos das sementes em relação aos internos. Esse processo leva ao desenvolvimento de rugas e rachaduras no tegumento e fissuras no eixo embrionário e nos cotilédones, sintomas típicos de deterioração severa. Essa deterioração geralmente está associada à maior predisposição das sementes aos danos mecânicos e ao ataque de pragas e patógenos (DELOUCHE, 1980; SEVERO e LIN, 1981; COSTA et

al., 1987). Fatores como lesões mecânicas durante a colheita e beneficiamento, lesões térmicas ocasionadas pela secagem com condições precárias de manuseio também podem causar perdas imediatas na germinação e no vigor. Esses fatores predispõem o lote de sementes à deterioração mais rápida durante o armazenamento. A deterioração é inevitável, podendo-se quando muito reduzir a velocidade de seu progresso, pelo emprego de técnicas adequadas de produção, secagem, beneficiamento, armazenamento e manuseio (CERQUEIRA e POPINIGIS, 1981).

Independentemente da escolha de regiões favoráveis à produção de sementes, do controle do ambiente no armazenamento ou dos arranjos de práticas culturais aplicadas à melhoria de sua qualidade, o fator determinante e fundamental da qualidade fisiológica é intrínseco e depende do controle genético dessa característica pelo cultivar (KRZYZAWONSKI et al., 1993). Assim, os cultivares comerciais de soja apresentam diferenças quanto à qualidade da semente. O lançamento de novos cultivares melhorados torna-se importante para a agricultura apenas quando a semente de boa qualidade está disponível para os agricultores em quantidade adequada e no lugar apropriado.

A seleção de cultivares com maior espessura de parede da vagem e menor índice de fissura é útil na melhoria da qualidade das sementes de soja (GILLIOLI e FRANÇA NETO, 1982). Maior resistência à deiscência e à deterioração das vagens é componente importante e representa a primeira barreira ligada à perda da qualidade das sementes por umidade e por microrganismos (KRZYZANOWSKI et al., 1993).

2.1.1. Germinação e vigor

Sementes com boa qualidade geralmente apresentam capacidade de germinação de 80% ou mais. Em algumas áreas do Rio Grande do Sul, onde a temperatura e a umidade são mais baixas, durante a maturação e a colheita da soja, podem-se obter sementes com alta capacidade de germinação. Em outras áreas, como no caso do Brasil-Central, é mais difícil a obtenção de sementes com alta germinação.

O objetivo do teste de germinação é obter informações sobre o valor das sementes para fins de semeadura e fornecer dados que possam ser usados para comparar diferentes lotes de sementes. Entretanto, nem sempre prediz o desempenho das plântulas no campo, pois é realizado em condições ótimas no laboratório (SILVA e ORTOLANI, 1981).

A ausência de uma relação estreita entre a germinação obtida em laboratório e a emergência em campo foi responsável pelo desenvolvimento do conceito de vigor (CARVALHO e NAKAGAWA, 1988). A conceituação de vigor tem sido muito estudada, mas ainda não se tem uma interpretação única, perfeitamente reconhecida e aceita por todos os pesquisadores de sementes, ou seja, não existe conceito amplamente aceito, ou um método padrão para determinação do vigor de sementes.

Os métodos que geralmente são mais utilizados para a avaliação do vigor das sementes são primeira contagem do teste de germinação, velocidade de germinação, teste de tetrazólio e envelhecimento acelerado. Dentre diferentes testes conduzidos em laboratório por MARCOS FILHO (1984), com o objetivo de avaliar a qualidade fisiológica de sementes de soja, o teste de germinação, primeira contagem e velocidade de germinação foram considerados os mais eficientes para identificar sementes com melhor potencial de emergência das plântulas no campo. Resultados obtidos neste trabalho também sugerem que a utilização de apenas um método de laboratório para estimar a qualidade potencial, bem como a avaliação de sua eficiência com o uso exclusivo da análise de correlação, poderá conduzir a informações incompletas e, ou, enganosas.

2.2. Peroxidação de lipídios

Os lipídios representam entre 17 e 22% da semente de soja (BEWLEY e BLACK, 1978). Os ácidos graxos polinsaturados, linoléico e linolênico destacam-se como os mais importantes, sendo susceptíveis à degradação oxidativa, por reações enzimáticas e não enzimáticas (ANDERSON e BAKER, 1983).

WILSON JR. e McDONALD JR. (1986) propuseram um modelo em que consideram que a peroxidação de lipídios está relacionada com a

deterioração de sementes. As sementes armazenadas, com grande reserva de lipídios, estão sujeitas a um lento e consistente ataque por oxigênio, formando hidroperóxidos, outros ácidos oxigenados e radicais livres. Os radicais livres são instáveis e reagem com as moléculas próximas transformando-as. Durante o período em que as sementes se apresentam secas e com ausência da atividade enzimática, os ácidos graxos livres se acumulam. A quantidade total de ácidos graxos livres acumulados pode ser proporcional à taxa de formação destes ácidos graxos livres e ao tempo de envelhecimento das sementes. Com a hidratação e germinação das sementes ocorre a degradação enzimática dos ácidos graxos livres, formação de produtos secundários tóxicos, e diminuição da qualidade fisiológica das sementes.

A velocidade de oxidação dos ácidos graxos é altamente acelerada pelas enzimas lipoxigenases existentes em sementes de muitas espécies, especialmente em soja (ARAÚJO, 1989).

A velocidade da reação de oxidação depende do grau de insaturação presente na molécula do ácido graxo. Quanto maior for o grau de insaturação presente no óleo e, ou, gordura, maior será a susceptibilidade à oxidação, e o primeiro produto formado é o hidroperóxido do ácido graxo (ARAÚJO, 1989).

Os radicais livres têm potencial para provocar danos aos constituintes celulares e tecidos conectivos. Têm sido relacionados com a danificação da membrana celular, por desesterificação dos fosfolipídios e conseqüente acumulação de ácidos graxos. A perda de integridade da membrana poderia então estar relacionada com a perturbação da biossíntese e degradação de fosfolipídios (BEWLEY, 1986).

A presença dos aldeídos formados da degradação de hidroperóxidos é uma das causas da formação dos sabores e odores desagradáveis de algumas sementes armazenadas, incluindo a soja (St ANGELO e ORY, 1983). Os aldeídos são responsáveis por vários efeitos citotóxicos nas células: inibem a síntese de DNA "in vitro" (DIANZANI, 1979) e a síntese de proteína "in vivo" (DHINDSA, 1982) e reagem com grupos sulfidrilas, provocando inativação de proteínas (BENEDETTI et al., 1980). Além disso, inibem as proteínas tubulinas, principais componentes dos microtúbulos,

necessárias para formação do fuso acromático (GABRIEL et al., 1977) e diminuem o índice de mitose em células (DIANZANI, 1979).

Lipoxigenases (E.C. 1.13.11.12) são enzimas que catalisam a adição de oxigênio molecular a ácidos graxos polinsaturados contendo o sistema cis, cis - 1,4 - pentadieno (AXELROD, et al., 1981; MACK et al., 1987). As lipoxigenases (LOX) estão presentes nas sementes de soja na forma de três isoenzimas. Os alelos que determinam a ausência dessas isoenzimas em sementes de soja são recessivos e possuem herança mendeliana simples. O loco L1 está ligado ao L2 e o loco L3 é independente (KITAMURA et al., 1983).

O ácido linolênico é o mais abundante ácido graxo que ocorre na maioria dos tecidos de plantas e o linoléico é encontrado em maior concentração em sementes (HILDEBRAND, et al., 1988). Na fração óleo de sementes de soja, o ácido linoléico representa em torno de 57% enquanto que o ácido linolênico corresponde de 7 a 9% (KITAMURA et al., 1984). Os ácidos linoléico e linolênico destacam-se como os mais suscetíveis à degradação oxidativa enzimática e não enzimática (ANDERSON e BAKER, 1983). A hidroxidação dos ácidos graxos polinsaturados pela ação de lipoxigenases leva a produção do 9 e do 13 hidroxídeos do ácido graxo, que por reações subsequentes produzem aldeídos e cetonas de cadeia curta (AXELROD et al., 1981; GERMAN e KINSELLA, 1985; LAKOKI et al., 1975).

NEFF et al. (1992) obtiveram correlação positiva entre o número de duplas ligações do ácido graxo (linoléico e linolênico) com a formação de peróxidos. Observaram também correlação negativa entre peróxidos formados com o teor de ácido oléico. A resistência de triacilgliceróis à reação de oxidação com o oxigênio diminuiu com o aumento do conteúdo de ácido linolênico e aumenta com o conteúdo de ácido oléico. Foi obtido também, aumento no conteúdo de compostos voláteis com aumento do conteúdo dos ácidos linoléico e linolênico.

NEFF et al. (1992) concluíram que a estabilidade oxidativa de óleo de canola foi melhorada com a diminuição de ácido graxos menos estáveis à oxidação (linoléico e linolênico), e com o aumento dos teores de ácidos graxos mais resistentes à oxidação (oléico, esteárico e láurico).

Não foi obtido diferença significativa entre genótipos com conteúdo normal e baixo conteúdo de ácido linolênico, para as características de produção média de sementes, altura de plantas, teor de proteína, dias para maturação e enchimento de grãos (WALKER et al. 1998).

TRAWATHA et al. (1995a) trabalharam com algumas isolinhas com ausência de diferentes isoenzimas lipoxigenases (LOX1, LOX 2 e LOX3) e com o cultivar Century. As sementes destes genótipos foram armazenadas e amostras foram retiradas periodicamente. Nas isolinhas e no cultivar Century foi obtida alta qualidade inicial, com perda de qualidade das sementes com o decorrer do armazenamento. Correlação negativa foi obtida entre os conteúdos de ácido linoléico e linolênico e a qualidade das sementes. A ausência de uma, duas ou três isoenzimas lipoxigenases não apresentou efeito negativo ou positivo na deterioração das sementes de soja.

Após o armazenamento de sementes de três cultivares de soja em diferentes temperaturas e diferentes períodos, TRAWATHA et al. (1995b), não observarem mudanças nos teores dos ácidos graxos totais e na fração lipídio. Os conteúdos dos ácidos linoléico e linolênico aumentaram cerca de duas vezes com a deterioração das sementes. Teores de ácido linolênico correlacionaram negativamente com a qualidade das sementes. Foi obtida baixa associação entre atividade de lipoxigenases e a qualidade das sementes.

O papel fisiológico das lipoxigenases em plantas não tem sido claramente demonstrado. Algumas hipóteses consideram que as isoenzimas lipoxigenases podem estar envolvidas com crescimento e desenvolvimento de plantas, senescência e resposta das plantas a ferimentos e resistência a pragas (HILDEBRAND et al., 1988).

Durante a maturação das sementes de espécies ricas em óleos, os lipídios armazenados são depositados em organelas especiais que são chamados de corpos lipídicos. Estas organelas são compostas de triacilgliceróis, que estão envolvidas por uma monocamada de fosfolipídios. Os corpos lipídicos são degradados nos estádios iniciais da germinação. As lipoxigenases de plantas têm sido bastante estudadas e é normalmente aceito que estas enzimas produzem hidroperóxidos com a utilização de ácidos graxos esterificados como substrato. Os hidroperóxidos são

metabolizados por várias vias secundárias e as quatro maiores rotas são das enzimas hidroperóxido liase, óxido aleno sintase, peroxigenase e divinil éter sintase. Os maiores responsáveis por funções biológicas nas plantas não são os hidroperóxidos, mas sim produtos provenientes destas rotas metabólicas como aldeídos em folhas, jasmonatos e outros ácidos graxos oxidados chamados de oxilipinas. Alguns destes compostos podem ser liberados de forma volátil nos tecidos das plantas e podem possuir funções específicas como moléculas sinalizadoras. Na monocamada fosfolipídica dos corpos lipídicos de várias espécies que possuem sementes ricas em óleo, no início da germinação podem ser detectadas em especial nas plântulas, a enzima 13-lipoxigenase (13-LOX), responsável pela oxidação do átomo de carbono da posição 13 na cadeia carbônica de um ácido graxo. Esta enzima tem a capacidade de oxidar resíduos de ácidos graxos esterificados, precedendo a ação de outra enzima responsável pela hidrólise de lipídios (lipases). Nestas sementes, durante os estádios iniciais da germinação há um grande aumento de hidroperóxidos nos corpos lipídicos (FEUSSNER et al., 2001).

Esses mesmos autores propõem então um novo modelo para o processo de utilização de lipídios armazenados, durante a germinação de sementes de determinadas espécies. Esse modelo LOX-dependente, difere do modelo clássico que considera a degradação peroxissomal e glioxissomal do ácido linolênico. Neste novo modelo, a oxidação de lipídios armazenados é catalisada por LOX que precede a hidrólise de triacilgliceróis por lipases específicas. Após a oxidação dos lipídios, ocorre formação de hidroperóxidos derivados que posteriormente são clivados por lipases. A seguir, ocorre o processo de degradação de lipídios ocorre a β -oxidação com produção de acetil-CoA, que são utilizados no crescimento das plântulas. No entanto parece que a via preferencial de degradação de lipídios armazenados depende da espécie. Milho parece ter a via clássica LOX-independente como preferencial. A via LOX-dependente parece ser preferencial para abóbora, couve flor e linho. Para soja a via preferencial ainda é objeto de pesquisa e estudos mais apropriados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material genético e procedimentos utilizados

O presente trabalho foi conduzido no campo experimental, no Laboratório de Análises de Sementes de Soja do Departamento de Fitotecnia e em laboratórios do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

O genótipo BARC-12 foi desenvolvido pelo USDA-ARS em Beltsville, MD (LEFFEL, 1994). Possui baixo teor de ácido linolênico e a presença das isoenzimas lipoxigenases (LOX 1, 2 e 3). O genótipo Doko-TN (triplo-nulo) é uma linhagem avançada do Programa de Melhoramento de Soja do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) que possui teor normal de ácido linolênico e ausência de lipoxigenases.

As sementes F1 híbridas provenientes do primeiro retrocruzamento entre BARC-12 e Doko TN foram identificadas por meio de determinação da atividade de lipoxigenases (OLIVEIRA et al., 1998). As sementes híbridas foram semeadas em vasos em casa de vegetação e conduzidas até o final do ciclo normal. As sementes F2 foram colhidas e identificadas para presença de lipoxigenases por meio de testes colorimétricos (SUDA et al., 1995) e por meio da determinação da atividade de lipoxigenases. Foi realizada também a determinação da composição de ácidos graxos da

fração óleo por cromatografia gasosa, utilizando-se a metodologia de BUBECK et. al. (1989) adaptada no laboratório do BIOAGRO. Em seguida, foram construídos quatro “bulks” de sementes de acordo com a presença/ausência de LOX e teores de ácido linolênico (Quadro 1). Dentro de cada “bulk” os indivíduos são similares para as características estudadas e arbitrários para as outras características que são segregantes.

Quadro 1 – “Bulks” formados na geração F2

Bulks	LOX 1,2,3	Ácido Linolênico
1	Presença	Normal
2	Presença	Baixo
3	Ausência	Normal
4	Ausência	Baixo

Após a identificação e construção dos “bulks” de sementes F2 com as características supracitadas, as sementes foram novamente plantadas em vasos, em casa de vegetação, conforme realizado para as sementes F1. As sementes F3 e F4, foram colhidas e, novamente identificadas e separadas em “bulks” conforme as características discriminadas na Tabela 1. As sementes F4 foram semeadas no campo e as sementes F5, foram colhidas com retardamento de colheita, nos estádios R8, R8+10, R8+20 e R8+30 dias. A qualidade das sementes foi avaliada por meio dos testes de germinação, envelhecimento acelerado, índice de velocidade de emergência e porcentagem de emergência de sementes no quinto dia após a semeadura no teste de velocidade de emergência. Além disso foram confirmadas as presenças/ausências de lipoxigenases e determinados os teores de ácido linolênico, lipídios totais e aldeídos totais.

3.2. Detecção da lipoxigenases 1 e 3 por meio de método colorimétrico

Conforme foi discutido anteriormente, o loco L1 está ligado ao loco L2, portanto não há necessidade de análises para detecção da isoenzima lipoxigenase 2. Na extração da isoenzima LOX 1 foram utilizadas entre 5 e

10 mg de semente de soja raspada, envolvendo tegumento e cotilédones em tubo de ensaio. Depois de macerado adicionou-se 0,5 mL de água deionizada. A água deionizada foi deixada em contato com a semente raspada durante cinco minutos para extração das isoenzimas. Separadamente, em um béquer, foi preparada uma solução contendo 25 mL de tampão borato de sódio 200 mM (pH 9,5), 2 mL de azul de metileno 100 mM, 3 mL de substrato linoleato de sódio 10 mM e 5 mL de água deionizada (solução suficiente para análise de 90 amostras). A detecção da LOX 1 consistiu em colocar em cada tubo de ensaio contendo a soja raspada e água deionizada, 0,4 mL da solução preparada. Na semente de soja contendo LOX 1 há a descoloração da solução e na semente de soja com ausência de LOX 1, há a permanência da cor azul.

Na extração da isoenzima LOX 3 foram utilizadas entre 5 e 10 mg de semente de soja raspada envolvendo tegumento e cotilédones em tubo de ensaio. No tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL de extrato de soja contendo somente a isoenzima LOX 2. O extrato contendo somente a LOX 2 foi obtido por meio da centrifugação a 13600g durante 15 minutos de 1 mg/mL (p/v) de sementes da linhagem CR 1,3 (sem LOX1 e 3), extraído em água deionizada. Separadamente em um béquer foi preparada uma solução contendo 25 mL de tampão fosfato de sódio 200 mM (pH 6,8), 2 mL de β -caroteno com 50% de saturação em acetona, 3 mL de substrato linoleato de sódio 10 mM e 5 mL de água deionizada. A detecção da LOX 3 consistiu em colocar em cada tubo de ensaio contendo a soja raspada e extrato da LOX 2, 0,4 mL da solução preparada. Na semente de soja contendo LOX 3 há o descoloramento rápido da solução e na semente de soja com ausência de LOX 3, há a permanência da cor do β -caroteno (amarelado).

3.3. Determinação da atividade de LOX 1 e LOX 3.

Na extração de lipoxigenases 1 e 3 foram maceradas 5 mg de sementes em gral previamente gelado e homogeneizado na presença de 600 mL de tampão Tris 60 mM, pH 8,2, contendo CaCl_2 15 mM e sacarose 13% (p/v) e mantido a -20°C . O homogenato foi centrifugado a 13.600g por 20 minutos a 4°C para utilização do sobrenadante (extrato bruto).

As atividades de LOX 1 e 3 foram determinadas espectrofotometricamente (OLIVEIRA et al. 1998). A determinação da atividade foi realizada pela medição da absorvância após um período de 2 minutos a 234 e 280 nm para LOX1 e LOX 3 respectivamente. As amostras de LOX1 foram constituídas de 1 mL de tampão borato de sódio 0,1 M, pH 9,5, 6 mL de linoleato de sódio 10 mM e 2,5 mL de extrato bruto. As amostras de LOX3 foram constituídas de 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,8, 35 mL de linoleato de sódio 10 mM e 15 mL de extrato bruto.

3.4. Teste de germinação

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes para cada “bulk” e época de colheita. Foi utilizado o método do rolo de papel, tendo o papel-toalha (germitest) umedecido com água desmineralizada como substrato. O volume de água utilizado para o umedecimento foi de 2,5 vezes o peso do substrato, e o rolo com as sementes foram mantidos no germinador à temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. As avaliações foram realizadas aos cinco e oito dias após a instalação do teste, segundo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992). Foram determinadas as porcentagens médias de plântulas normais obtidas.

3.5. Teste de envelhecimento acelerado

Para cada cultivar ou linhagem e época de colheita foram colocadas 200 sementes sobre bandeja de tela, em caixas gerbox adaptadas (11 x 11 x 3,5 cm), contendo ao fundo 40 ml de água desmineralizada. Fixaram-se duas folhas de papel-toalha (Germitest) na parte inferior da tampa de cada caixa gerbox, para absorver possível condensação da água. Em seguida, as caixas foram fechadas e lacradas com fita crepe para evitar perda ou troca de umidade, mantendo 100% de umidade relativa no seu interior. As caixas foram transferidas para uma estufa incubadora, onde ficaram por 48 horas a 41°C e 100% de umidade relativa, conforme recomendação de KRZYZANOWSKI et al. (1991).

Após o período de envelhecimento, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, em quatro repetições de 50 sementes, da mesma forma descrita no item 3.4. As avaliações foram realizadas cinco dias após a instalação do teste. Foram determinadas as porcentagens de plântulas normais e anormais.

3.6. Determinação do índice de velocidade de emergência

O teste de velocidade de emergência foi realizado em substrato de areia em casa de vegetação, com a utilização de quatro repetições de 50 sementes. Foram feitas contagens do número de plântulas emergidas diariamente, até que este número permanecesse constante. Para a determinação do índice de velocidade de emergência, foi utilizada a fórmula proposta por MAGUIRE (1962):

$$IVE = \frac{N1}{D1} + \dots + \frac{Nn}{Dn}$$

em que

IVE = índice de velocidade de emergência;

N1 = número de plantas emergidas na primeira contagem;

D1 = número de dias para a primeira contagem;

Nn = número de plantas emergidas na última contagem; e

Dn = número de dias para a última contagem.

Neste teste foi avaliada também a porcentagem de emergência de sementes no quinto dia após a semeadura no teste de velocidade de emergência. Foram determinadas as porcentagens de emergência de quatro repetições de 50 sementes.

3.7. Determinação de aldeídos totais

Os teores de aldeídos totais foram determinados pelo método colorimétrico desenvolvido por SANTOS et al. (1993). Este método utiliza como reagente de cor o 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH).

Foram analisadas três repetições de 10 gramas de sementes de cada cultivar ou linhagem, para cada época de colheita. Depois de semeadas em rolo de papel-toalha (Germitest) previamente umedecido com água destilada, as sementes foram colocadas em germinador a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24 horas. Após esse período, foram retiradas, colocadas em erlenmeyers contendo 40 ml de solução de etanol absoluto a 2% (v/v) e incubadas novamente em germinador a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por duas horas, para extração de aldeídos. Ao serem retiradas do germinador, de cada erlenmeyer foi tomada uma alíquota de 1 ml da solução, colocada em tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 1 ml de solução de MBTH a 0,1% e 2,5 ml de FeCl_3 a 0,23%. A leituras foram realizadas em cada amostra exatamente cinco minutos após a adição de MBTH. A absorvância foi lida em espectrofotômetro BECKMAN modelo DU-65, a 635 nm e os resultados expressos em valores de absorvância por 10 gramas de sementes.

3.8. Determinação de ácidos graxos

A identificação e a quantificação do ácido linolênico presente nas sementes de soja, foi realizada por cromatografia gasosa. Foi utilizado um método “não destrutivo”, em que as sementes não perdem sua capacidade de germinação. A porção das sementes a serem analisadas foi cortada e triturada manualmente por meio de uma lâmina. A cada amostra de 15 mg do material triturado foi adicionado 1 mL de hexano, sendo a mistura mantida a 4°C por cerca de 16 horas, sob atmosfera de N_2 . Após esse tempo, a solução de lipídios e hexano foi transferida para outro tubo e o solvente, evaporado por borbulhamento de N_2 . Para a obtenção de ésteres metílicos, foi utilizada uma modificação da metodologia descrita por BUBECK et. al. (1989). À fração lipídica foi adicionado 0,4 mL de metóxido de sódio 1 M, e os tubos foram mantidos em banho maria, a 30°C , por cerca de uma hora. Em seguida, foram acrescentados 1 mL de água e 1 mL de hexano, e após uma hora, com auxílio de uma pipeta, cerca de 0,75 ml da fase orgânica foi transferido para outros tubos, aos quais foi adicionado sulfato de sódio anidro. Finalmente, 1 mL da fase orgânica foi injetado em cromatógrafo a gás. Foram utilizadas as seguintes condições de análise:

temperatura da coluna, 225 °C; do injetor, 245 °C; do detector, 280 °C. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio com fluxo de 1,3 mL/min.

3.9. Determinação dos teores de lipídios

Os lipídios foram determinados em extrator de Soxhlet, com utilização do éter de petróleo como solvente, segundo o procedimento descrito em Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985), com refluxo por 10 horas. Determinaram-se três repetições de três gramas, de cada cultivar ou linhagem, em cada época de colheita. Após 10 horas de refluxo, o éter foi recuperado e o óleo de cada amostra obtido em balão de fundo chato, foi colocado em estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 3,5 horas. Em seguida, os balões foram retirados da estufa, resfriados à temperatura ambiente por 1,5 horas e pesados. Após a primeira pesagem, os balões foram levados novamente à estufa por 40 minutos, deixados para resfriar e pesados. Este processo foi repetido até as amostras atingirem peso constante. A porcentagem de óleo extraída foi calculada por diferença de pesagem.

3.10. Análise estatística

No experimento foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, e os dados foram submetidos à análise de variância. Os dados obtidos foram analisados com utilização do esquema fatorial, incluindo o estudo da interação entre os “bulks” e as épocas de colheita. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de regressão polinomial.

Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de Lilifors para observação se os dados obedeciam à distribuição normal. Os dados que não seguiram a distribuição normal foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{\%/100}$, de acordo com GOMES (1990).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de variância do experimento relativas aos dados de germinação, envelhecimento acelerado, índice de velocidade de emergência, aldeídos totais, lipídios e ácido linolênico encontram-se no Quadro 1.

4.1. Germinação

Foram obtidas diferenças significativas entre os “bulks” estudados, no entanto, não foi observada interação entre as épocas de colheita e os “bulks” para as características plântulas normais obtidas no teste padrão de germinação. Foi observada queda mais acentuada na germinação de sementes somente no “bulk” com teor normal de ácido linolênico e ausência de LOX. O “bulk” com baixo teor de ácido linolênico e presença de lipoxigenase apresentou melhor qualidade de sementes em relação aos outros “bulks”. Com o retardamento de colheita no campo, não foi observada também queda na germinação das sementes deste “bulk”. O “bulk” com baixo teor de ácido linolênico e com ausência de lipoxigenase e o “bulk” com teor normal de ácido linolênico e presença de lipoxigenase apresentaram comportamento intermediário em relação à qualidade das sementes (Figura 1).

Quadro 1 – Análise de variância dos dados de plântulas normais na germinação, plântulas normais e anormais no teste de envelhecimento acelerado, índice de velocidade de emergência, porcentagem de plântulas no quinto dia do teste de velocidade de emergência, aldeídos totais, lipídios totais, teores de ácido linolênico, teores de lipídios e aldeídos totais nos “bulks” estudados, em quatro épocas de colheita

Fonte de Variação	GL	Germinação	Envelhecimento acelerado	Envelhecimento acelerado	Índice velocidade emergência (IVE)	% emergência de plântulas normais (quinto dia - IVE)	Lipídios totais	Ácido linolênico	Aldeídos totais
			Plântulas normais	Plântulas anormais					
“bulk”.	3	356,51 **	267,83 **	237,43 **	1162,61**	4605,67**	16,86**	53,12 **	0,057 **
Época/”bulk”	12	47,34 ^{n.s.}	131,87 **	106,02 **	456,77 **	762,54**	0,39**	1,06 **	0,018 ^{n.s.}
Época/”Bulk” 1	3	123,51 ^{n.s.}	29,69 **	594,57 **	7,67 **	809,55**	0,33 ^{n.s.}	3,03 **	0,55 ^{n.s.}
Época/”Bulk” 2	3	96,75**	15,52 **	166,25 **	3,95 **	276,56**	0,56**	0,04 ^{n.s.}	0,01 ^{n.s.}
Época/”Bulk” 3	3	25,72 ^{n.s.}	215,08 **	14,54 ^{n.s.}	185,96 **	521,78*	0,47 ^{n.s.}	0,03 ^{n.s.}	0,02 ^{n.s.}
Época/”Bulk” 4	3	14,23**	999,64 **	450,94 **	490,32 **	1449,56**	0,02 ^{n.s.}	0,33 **	0,03 ^{n.s.}
Erro	48	25,56	21,13	23,18	26,49	55,71	1,53	0,03	0,013
C.V. (%)		7,24	7,44	35,90	7,37	18,46	0,10	3,33	23,12

* e ** Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

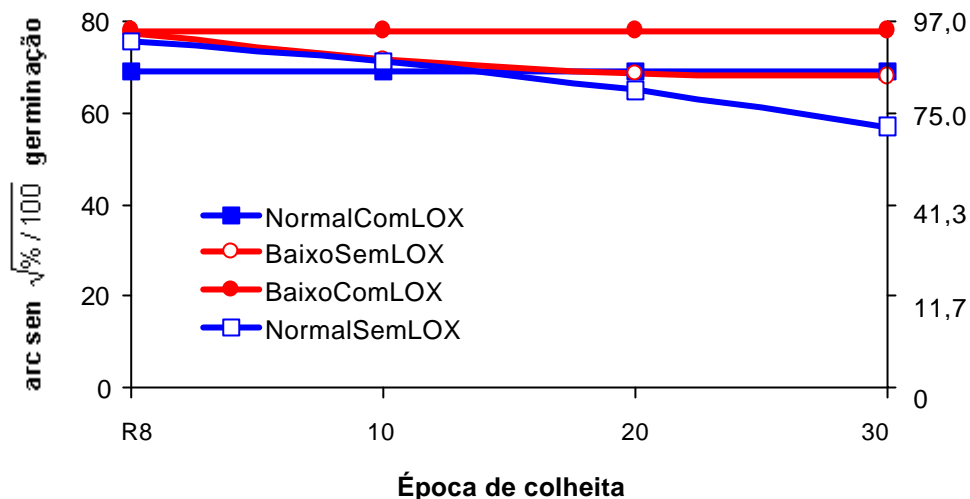


Figura 1 – Plântulas normais (%) obtidas no teste de germinação das sementes dos “bulks” estudados em quatro épocas de colheita, a partir do R8.

4.2. Envelhecimento acelerado

As sementes de todos os “bulks” avaliados apresentaram queda no vigor quando submetidas ao estresse de alta temperatura e alta umidade relativa. Foi observado comportamento diferente entre os “bulks” com teor normal de ácido linolênico em relação aos “bulks” com baixo teor de ácido linolênico em suas sementes. Em todos os materiais genéticos estudados foi observada queda significativa do vigor com o retardamento de colheita das sementes no campo (Figura 2). Queda mais acentuada na qualidade das sementes com teor normal de ácido linolênico foi observada após o estágio R8+20 dias. Trinta dias após o estágio R8, os “bulks” com teor normal de ácido linolênico apresentaram porcentagem de germinação cerca de 20% menor após o processo de envelhecimento acelerado (Figura 2). Esse comportamento indica menor vigor das sementes dos “bulks” com teores normais de ácido linolênico em relação aos “bulks” com baixo teor de ácido linolênico.

Esses resultados estão de acordo com alguns autores como ARAÚJO (1989) que afirma que a velocidade de oxidação depende do grau de insaturação do ácido graxo. Quanto maior for o número de insaturações do

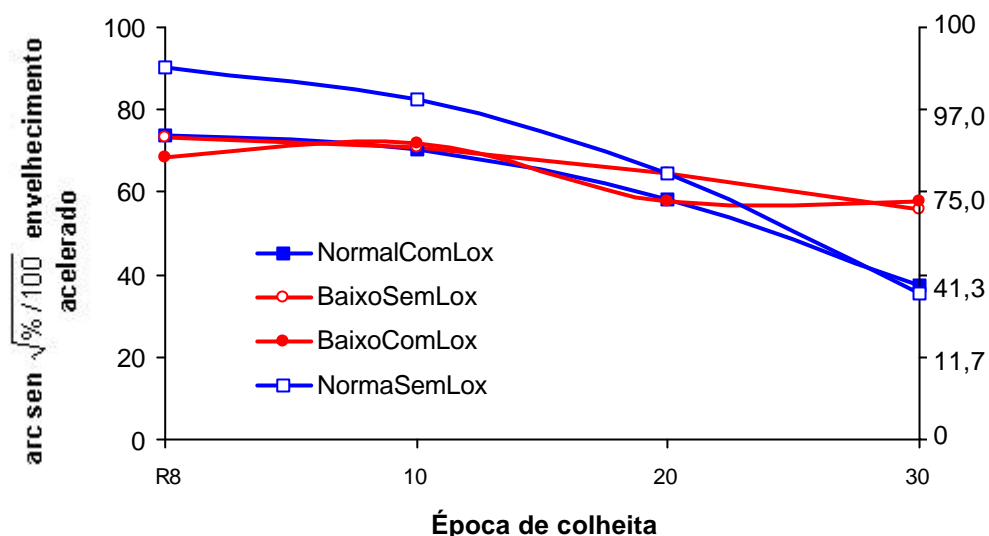


Figura 2 - Germinação (%), obtidas no teste de envelhecimento acelerado nas sementes dos “bulks” estudados em quatro épocas de colheita, a partir do R8.

ácido graxo, maior será a susceptibilidade à oxidação, e o produto formado é o hidroperóxido do ácido graxo. ANDERSON e BAKER (1983) afirmaram também que os ácidos linolêico e linolênico são mais susceptíveis à degradação oxidativa e não oxidativa. NEFF et al. (1992) observaram correlação positiva entre duplas ligações dos ácidos graxos (linolêico e linolênico) com a formação de peróxidos e de compostos voláteis. A consequência da maior peroxidação e produção de ácidos graxos é a deterioração mais rápida conforme observado nos resultados para sementes com maior teor de ácido linolênico. WILSON JR. e Mc DONALD JR. (1986) consideram que a peroxidação dos lipídios com formação de produtos secundários é um dos principais processos responsáveis pela deterioração das sementes.

Na monocamada fosfolipídica dos corpos lipídicos de várias espécies que possuem sementes ricas em óleo, no início da germinação podem ser detectadas em especial nas plântulas, a enzima 13-lipoxigenase (13-LOX) responsável pela oxidação do átomo de carbono da posição 13 na cadeia carbônica de um ácido graxo. Esta enzima tem a capacidade de oxidar resíduos de ácidos graxos esterificados, precedendo a ação de outra

enzima responsável pela hidrólise de lipídios (lipases). Nestas sementes, durante os estádios iniciais da germinação há um grande aumento de hidroperóxidos nos lipídios armazenados (FEUSSNER et al., 2001).

Os dados obtidos sugerem que sementes com maior teor de ácidos graxos insaturados são mais susceptíveis à peroxidação, com produção de maior quantidade de produtos secundários tóxicos como peróxidos e compostos voláteis. Conseqüentemente, estas sementes devem estar mais predispostas à deterioração quando expostas em condições desfavoráveis no campo.

Os resultados deste trabalho estão de acordo com os resultados obtidos por TRAWATHA et al. (1995a e 1995b). Esses autores trabalharam com sementes armazenadas à temperatura ambiente. Em amostras destas sementes e foram realizadas avaliações da qualidade fisiológica em diferentes períodos de tempo. Nas sementes com maior teor dos ácidos linolênico e linoléico foi observada perda mais rápida da qualidade das sementes com o armazenamento. O papel fisiológico das isoenzimas lipoxigenases não têm sido claramente demonstrado. Algumas hipóteses consideram que estas enzimas estão envolvidas com crescimento e desenvolvimento de plantas, senescência e resposta das plantas a ferimentos e resistência a pragas (HILDEBRAND et al., 1988).

As lipoxigenases produzem hidroperóxidos com a utilização de ácidos graxos esterificados como substrato. Os hidroperóxidos são metabolizados por várias vias secundárias e as quatro maiores rotas são das enzimas hidroperóxido liase, óxido aleno sintase, peroxigenase e divinil éter sintase. Os maiores responsáveis por funções biológicas nas plantas não são os hidroperóxidos, mas sim produtos provenientes destas rotas metabólicas como aldeídos em folhas, jasmonatos e outros ácidos graxos oxidados chamados de oxilipinas. Alguns destes compostos podem ser liberados de forma volátil nos tecidos das plantas e podem possuir funções específicas como serem moléculas sinalizadoras (FEUSSNER, 2001).

De acordo com ARAÚJO (1989), a velocidade de oxidação dos ácidos graxos é altamente acelerada pelas lipoxigenases existentes em sementes de muitas espécies, especialmente em soja. Nos resultados obtidos nos testes de germinação e envelhecimento acelerado não foi possível observar

uma associação entre a presença de lipoxigenases com a qualidade das sementes, tanto em sementes com teor normal ou baixo teor de ácido linolênico. A maior queda na qualidade das sementes, verificada na colheita 30 dias após o estágio R8 no teste de velocidade de emergência esteve associada ao teor do ácido linolênico. Resultados semelhantes foram obtidos por TRAWATHA e al. (1995a), em que a ausência de uma, duas ou três isoenzimas lipoxigenases não apresentou efeito negativo ou positivo na deterioração de sementes de soja armazenadas por diferentes períodos de tempo. A menor porcentagem de plântulas anormais obtida no teste de envelhecimento acelerado evidencia melhor qualidade das sementes com baixo teor linolênico em relação às sementes com teor normal do ácido graxo (Figura 3). Na colheita realizada dez dias após o estágio R8, os “bulks” de sementes com teor normal de ácido linolênico já apresentaram número maior de plântulas anormais em relação aos “bulks” com baixo teor de ácido linolênico. Na colheita realizada trinta dias após o estágio R8, os “bulks” com teor normal de ácido linolênico apresentaram porcentagem em torno de 20% maior de plântulas anormais.

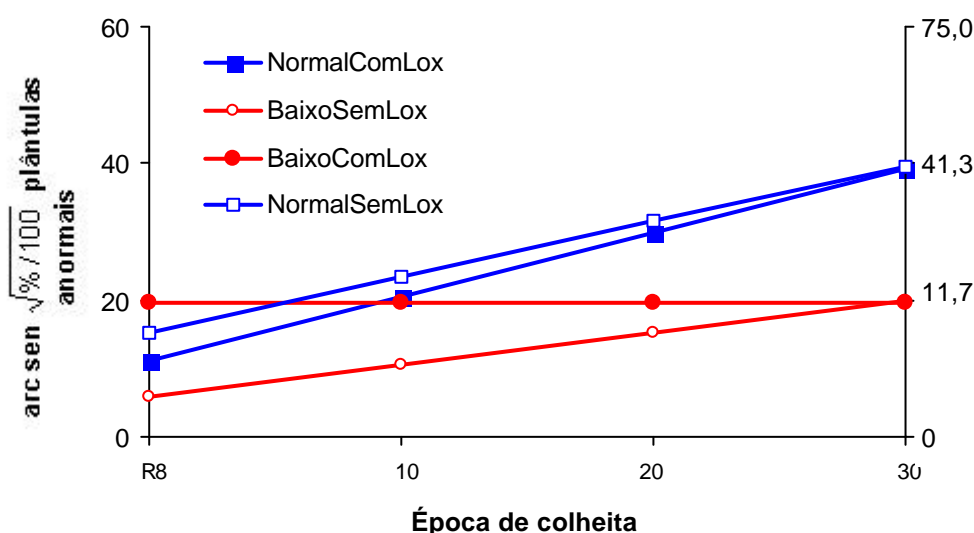


Figura 3 – Plântulas anormais (%), obtidas no teste de envelhecimento acelerado nos “bulks” estudados em quatro épocas de colheita, a partir do R8.

4.3. Índice de velocidade de emergência

No teste de índice de velocidade de emergência foi possível a observação de associação entre a presença da enzima lipoxigenase e o vigor das sementes. Foi observada maior velocidade de emergência nos “bulks” com presença de lipoxigenases em relação aos “bulks” com ausência de lipoxigenases até o estágio de colheita R8+20 dias (Figura 4). Após esse período foi observada forte queda do índice de velocidade de emergência no “bulk” com presença de lipoxigenase e teor normal de ácido linolênico.

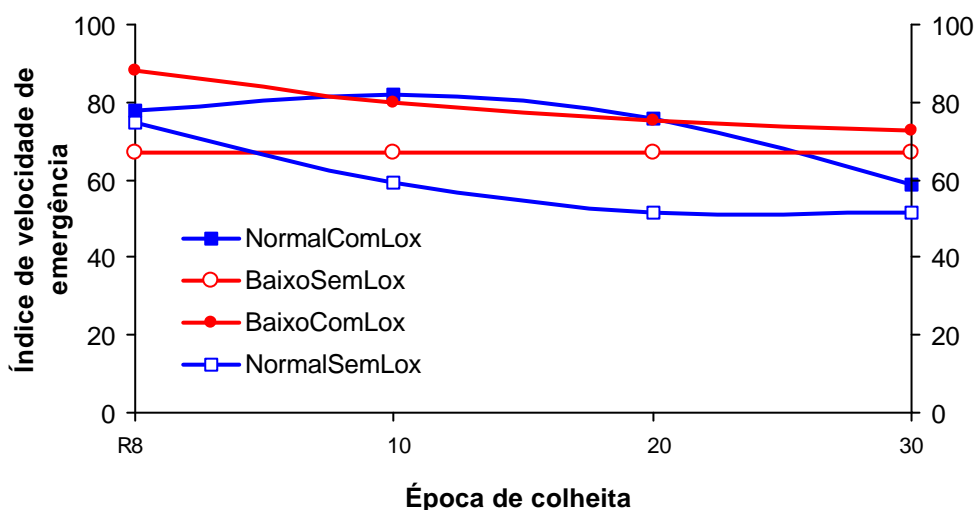


Figura 4 – Índice de velocidade de emergência (IVE) nos “bulks” estudados em quatro épocas de colheita, a partir do R8.

Os ácidos graxos insaturados estão presentes tanto como constituintes da membrana celular como dos lipídios de reserva. Sementes com presença de lipoxigenase e teores mais altos de ácido linolênico apresentaram manutenção do índice de velocidade de emergência e logo depois uma queda (Figura 5).

A manutenção de uma alta velocidade de emergência até o estágio R8+20 dias pode estar relacionada inicialmente à facilidade na mobilização de lipídios pela presença das enzimas lipoxigenases. O comportamento de queda após este estágio, pode estar relacionado à produção de quantidade

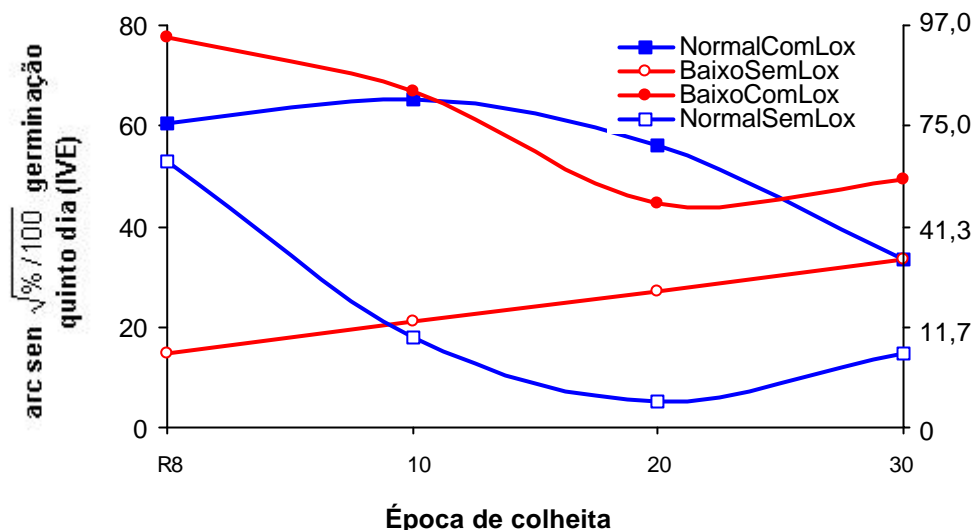


Figura 5 – Germinação (%), obtidas no quinto dia do teste de índice de velocidade de emergência nos “bulks” estudados em quatro épocas de colheita, a partir do R8.

expressiva de compostos secundários nestas sementes. Nas sementes com teor normal de ácido linolênico e ausência de lipoxigenase foi observada uma queda do índice de velocidade de emergência. A ausência de lipoxigenase pode estar relacionada com a menor mobilização de lipídios, refletindo em menor velocidade de emergência quando comparado com “bulks” com presença de lipoxigenase. Resultados semelhantes e de melhor visualização podem ser observados nos dados provenientes da porcentagem de plântulas normais após o quinto dia de implantação do teste de índice de velocidade de emergência (Figura 5).

4.4. Teores de ácido linolênico, lipídios e aldeídos totais

Os teores de ácido linolênico foram determinados nas sementes, nas gerações de F2 a F5. Nos resultados obtidos na geração F5, podemos observar que nos “bulks” com baixo teor ácido linolênico, os teores estiveram em torno de 4% de ácido linolênico (Figura 6), e nos “bulks” com teor normal de ácido linolênico os teores variaram entre 6% e 8%.

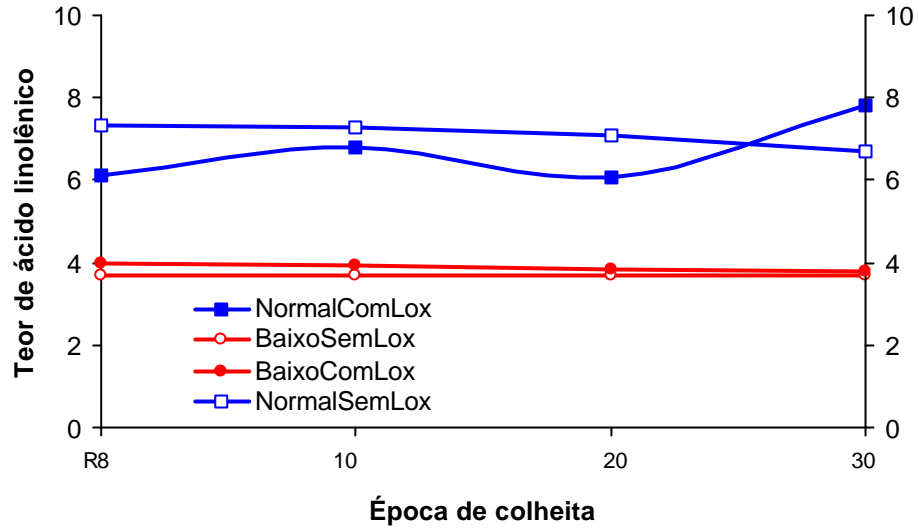


Figura 6 – Teor de ácido linolênico (%) obtidos nos “bulks”, estudados em quatro épocas de colheita, a partir do R8.

Varição significativa do teor de ácido linolênico com o retardamento de colheita no campo foi observada somente no “bulk” com teor normal de ácido linolênico e presença da enzima lipoxigenase. Variações significativas nos teores de lipídios em relação ao retardamento de colheita no campo foram observadas somente no “bulk” com baixo teor de ácido linolênico e com ausência de lipoxigenase nas sementes. Os resultados obtidos para teores de lipídios totais e aldeídos totais não foram conclusivos em relação aos diferentes períodos de retardamento de colheita no campo. (Figuras 7 e 8).

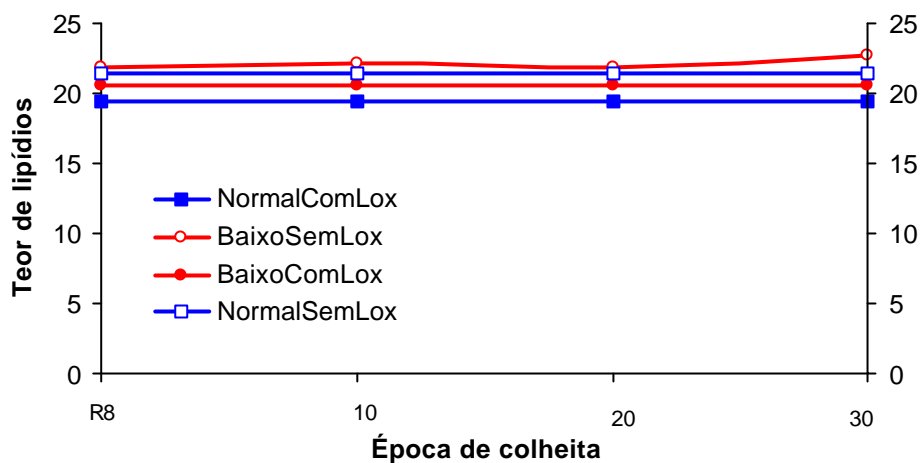


Figura 7 – Teor de lipídios totais (%) obtidos nos “bulks”, estudados em quatro épocas de colheita, a partir do R8.

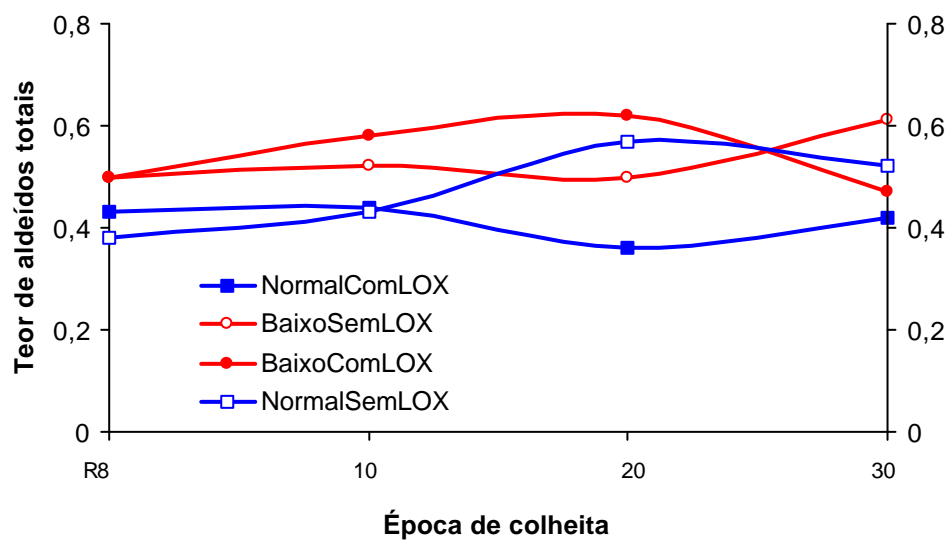


Figura 8 – Teor de aldeídos totais (%) obtidos nos “bulks”, estudados em quatro épocas de colheita, a partir do R8.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

O trabalho foi realizado em campo experimental e em laboratórios do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), na Universidade Federal de Viçosa. Os objetivos deste trabalho foram determinar o papel fisiológico das isoenzimas lipoxigenases e da composição de ácidos graxos da fração óleo na qualidade e vigor de sementes de soja.

O genótipo BARC-12 tem baixo teor de ácido linolênico e a presença das isoenzimas LOX 1, 2 e 3. Doko-TN é linhagem triplo-nula (com ausência de lipoxigenases) do programa de melhoramento de soja da Universidade Federal de Viçosa e possuem teor normal de ácido linolênico.

Sementes F1 híbridas provenientes do segundo retrocruzamento entre BARC-12 x Doko-TN foram confirmadas por meio de determinação da atividade enzimática. Em seguida, foram plantadas em vasos em casa de vegetação. Na geração F2 foram identificadas as sementes com a presença e sementes com ausência de lipoxigenase por meio de testes colorimétricos e de determinação da atividade das isoenzimas LOX1 e 3. Foram determinados também os teores dos ácidos graxos das sementes por meio de cromatografia gasosa. Em seguida, foram formados "bulks" com as seguintes características: presença de lipoxigenase e teor normal de ácido linolênico, presença de lipoxigenase e baixo teor de ácido linolênico,

ausência de lipoxigenase e teor normal de ácido linolênico e ausência de lipoxigenase e baixo teor de ácido linolênico.

Após a identificação das sementes F2 com as características supracitadas, as sementes foram novamente plantadas em vasos, em casa de vegetação conforme realizado para as sementes F1. Sementes F3 e F4, foram colhidas e feita a confirmação das características conforme os "bulks" formados anteriormente. As sementes foram semeadas no campo para a formação das sementes F5. As sementes F5, foram colhidas com retardamento de colheita, nos estádios R8, R8+10, R8+20 e R8+30 dias. A qualidade e o vigor das sementes foram avaliados por meio dos testes-padrão de germinação, envelhecimento acelerado e teste de velocidade de emergência em substrato de areia. Foram determinados também os teores de ácido linolênico, lipídios totais e aldeídos totais.

Sementes com baixo teor de ácido linolênico apresentaram no teste de envelhecimento acelerado maior porcentagem de germinação e menor número de plântulas anormais após o estágio R8+20 dias. Sementes com presença de lipoxigenase apresentaram maior velocidade de emergência e maior porcentagem de plântulas emergidas no quinto dia após a implantação do teste de velocidade de emergência. Os resultados indicam que a característica baixo teor de ácido linolênico contribuiu com uma maior qualidade e vigor de sementes de soja e a presença de lipoxigenase contribuiu com o vigor das sementes na forma de maior velocidade de emergência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-BAKI, A.A., ANDERSON, J.D. Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. **Crop Sci.**, v.13, n.6, p.630-633, 1972.
- ANDERSON, J.D., BAKER, J.E. Deterioration of seeds during aging. **Phytopathology**, v.73, n.2, p. 321-325, 1983.
- ARAÚJO, J.M.A. **Oxidação de lipídios**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1989. 22p. (Boletim de extensão, 283).
- AXELROD, V., CHEESBROUGH, T.M., LAASKO, S. Lipoxygenase from soybeans. **Methods Enzymol.**, v.71, p.441-451, 1981.
- BENEDETTI, A., COMPORTI, M., ESTERBAUER, H. Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. **Biochem. Biophys. Acta**, v.620, p.281-296, 1980.
- BEWLEY, J.D. Membrane changes in seed as related to germination and the perturbations resulting from deterioration in storage. In: McDONALD JR., M.B., NELSON, C.J. (Eds.) **Physiology of seed deterioration**. Madison: Crop Science Society of America, 1986. p.27-45.
- BEWLEY, J.D., BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. 1. Development, germination and growth**. Berlin, Springer-Verlag, 1978. 306p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para análises de sementes**. Brasília, DF.: 1992. 365p.

- BUBECK, D.M., FEHR, W.R., HAMMOND, E.G. Inheritance of palmitic and stearic acid mutants of soybean. **Crop. Sci.**, v.29, p.652-656, 1991.
- CARRARO, I.M. **Efeito do retardamento de colheita e do tratamento das sementes sobre a germinação, vigor e a nodulação da soja** (*glycine max* (L.) Merrill). Viçosa, MG. 102p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1979.
- CARVALHO, N.M., NAKAGAWA, J. **Sementes; ciência, tecnologia e produção**. 3.ed., Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424p.
- CERQUEIRA, W.P., POPINIGIS, F. Sementes. In: MIYASAKA, S., MEDINA, J.C. (Eds.) **A soja no Brasil**. s.l.: ITAL, 1981, p.711-714.
- COSTA, A.V. **Avaliação da qualidade fisiológica da semente de soja** (*Glycine max* (L.) Merrill) **com tegumento impermeável, produzido em três localidades do Brasil Central**. Viçosa, MG. 146p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1984.
- COSTA, A.V., SEDIYAMA, T., SILVA, R.F., et al. **Alguns fatores que afetam a qualidade fisiológica da semente de soja**. Goiânia: EMGOPA, 1987. 48p.
- DELOUCHE, J.C. Environmental effects on seed development and seed quality. **Hortscience**, v.15, n.6, p.775-780, 1980.
- DELOUCHE, J.C., MATHES, R.K., DOUGHERTY, G.M., et al. Storage of seed in subtropical and tropical regions. **Seed Sci. and Techn.**, v.1, n.3, p.663-692, 1973.
- DHINDSA, R. Inhibition of protein syntesis by products of lipid peroxidation. **Phytochemistry**, v.21, n.2, p.309-314, 1982.
- DIANZANI, M.V. Biological activity of methylglyoxal and related aldehydes. In: CIBA Foundation Series. **Submolecular biology and Cancer**, v.67, p.245-270, 1979. (Exerpa Medica Amsterdam).
- DIAS, A.C.P. **Atividade de lipoxigenases durante a germinação e qualidade fisiológica de sementes de soja**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 68p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- FEUSSNER, I., KÜHN, H., WASTERACK, C. Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. **Plant Science**, v.6, n.6, p.268-273, 2001.

- GABRIEL, L., BONELLI, G., DIANZANI, M.U. Inhibitor of colchicine binding to rat liver tubulin by aldehydes and by linoleic acid hydroperoxide. **Chemical - Biological Interactions**, v.19, p.101-109, 1977.
- GERMAN, J.B., KINSELLA, J.E. Lipid oxidation in fish tissue. Enzymatic initiation via lipoxygenase. **J. Agr. Food Chem.** v.33, p.680-683, 1985.
- GILLIOLI, J.L., FRANÇA NETO J.B. Efeito de esscarificação mecânica e do retardamento de colheita na emergência de semente de soja com tegumento impermeável. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2, 1981. Brasília, DF. **Anais...** Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1982. v.1, p.601-609.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 13.ed. Piracicaba: ESALQ/USP, 1990. 468p.
- HILDEBRAND, D.F., HAMILTON-KEMP, T.R., LEGG, C.S., BOOKJANS, G. **Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology**, 1988, v.7, p.201-219.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz; métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed., São Paulo: 1985. v.1, 533p.
- KITAMURA, K. Biochemical of lipoxygenase lacking mutants, L1-Less, L2-Less and L3-Less soybeans. **Agric. Biol. Chem.**, v.48, n.9, p.2339-2346, 1984.
- KITAMURA, K., DAVIES, C.S., KAIZUMA, N., NIELSEN, N.C. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. **Crop Sci.**, v.23, p.924-927, 1983.
- KRZYZANOWSKI, F.C., GILIOLI, J.L., MIRANDA, L.C. Produção de sementes nos cerrados. In: ARANTES, N.E., SOUZA, P.I.M.de. (Eds.) **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFÓS. 1993, p. 465-522.
- KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.S. Relato dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. In: **Informativo ABRATES**, v.1, n.2, p.15-50, 1991.
- LAKOKI, J.W., EMKEN, E.A., LAW, J.H., KEZON, F. Genetic analysis of action of soybean lipoxygenase on linolenic acid. **J. Biol. Chem.**, v.251, p.6001-6006, 1976.
- LEFFEL, R.C. Registration of BARC-12 a low linolenic acid soybean germplasm line. **Crop Sci.**, v.34, p. 1426-2427, 1994.

- MACK, A. J., PETERMAN, T.K., SIEDOW, J.N. **Current Topics in Biological and Medical Research**, v.13, p.127-154. 1987.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, v.2, p. 176-177. 1962.
- MARCOS FILHO, J. Testes de avaliação do vigor de sementes de soja e suas relações com a emergência das plântulas no campo. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.19, n.5, p.605-613, 1984.
- NEFF, W.E., SELKE, E., MOUNTS, T.L., RINSH, W. FRANKEL, E.N., ZEINTOUN. M.A.M. Effect of triacylglycerol composition and structures on oxidative stability of oils from selected soybean germoplasm. **JACOS**, n.2, v.69, p. 111-118, 1992.
- NEFF, W.E., SELKE, E., MOUNTS, T.L., RINSH. Oxidative stability as affected by triacylglycerol composition and structure of purified canola oil triacylglycerol from genetically modified normal and high stearic and lauric acid canola varieties. **Lebensm. – wiss. u. – technol.**, v.30, p.793-799, 1997.
- OLIVEIRA, D.A, PIOVESAN, N.D.,MORAES, R.M.A., ROCHEBOIS, G.B., OLIVEIRA, M.G.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identification of the three genotypic classes for soybean lipoxygenases 1 and 3 based on enzymatic activity. **Biotechnology Techniques.**, v.12, p.71-74, 1998.
- OLIVEIRA, D.A. **Qualidade fisiológica e produção de aldeídos em sementes de linhagens com ausência de lipoxigenases e em sementes de cultivares de soja.** Viçosa, MG: UFV, 1996. 67p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- QUEIROZ, L.R. **Produção de aldeídos na germinação e qualidade de sementes de genótipos de soja com ausência de lipoxigenases.** Viçosa, MG: UFV, 1993. 53p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1993.
- QUEIRÓZ, T.F.N. **Qualidade fisiológica de genótipos de soja sem lipoxigenases.** Viçosa, MG: UFV, 2000. 56p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- RAHMAN, S.M., TAKAGI, Y. KINOSHITA, T., Genetic control of high oleic acid content in the seed oil of soybean mutants, **Crop Science**, V.38, P.1125-1128, 1996.

- REBETZKE, G.J., BURTON, J.W. CARTER, T.E., WILSON, R.F. Genetic variation for modifiers controlling reduced saturated fatty acid content in soybean. **Crop Science**, v..3, p. 303-308, 1998.
- SANTOS, I.C., REIS, W.J.P., MOREIRA, M.A., et al. Determinação de aldeídos totais para avaliar o potencial de germinação e o vigor de sementes de soja. **Rev. Ceres**, v.40, n.231, p.438-444, 1993.
- SEDIYAMA, T., PEREIRA, M.G., SEDIYAMA, C.S., et al. **Cultura da soja - I parte**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1985a. 96p. (Boletim de Extensão, 211).
- SEVERO, J.L., LIN, S.S. Efeito do período de colheita no vigor e fitossanidade das sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Agron. Sulriograndense**, v.17, n.2, p.257-271, 1981.
- SILVA, C.M. da, ORTOLANI, D.B. Avaliação da qualidade da semente. h: MIYASAKA, S., MEDINA, J.C. **A soja no Brasil**, s.l.: ITAL, 1981. p.736-743.
- St. ANGELO, A.J., ORY, T.L. Lipid degradation during seed deterioration. **Phytopathology**, v.73, n.2, p.315-317, 1983.
- SUDA, I., HAJIKA, M., NISHIBA, Y., FURUTA, S., IGITA, K. Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxygenase isozymes in soybean seeds. **J. Agric. Food Chem.**, v.43, p.742-747, 1995.
- TRAWATHA, S.E., TEKRONY, D.M., HILDEBRAND, D.F. Soybean lipoxygenase mutants and seed longevity. **Crop Science**, v.35, p.862-868, 1995a.
- TRAWATHA, S.E., TEKRONY, D.M., HILDEBRAND, D.F. Soybean lipoxygenase mutants and seed longevity. **Crop Science**, v.35, p.1415-1422, 1995b.
- WALKER, J.B., FEHR, W.R., WELKE, G.A., HAMMOND, E.G., DUVICK, D.N., CIANZIO, S.R. Reduced-linoleate content associations with agronomic and seed traits of soybean, **Crop Science**, v.38, p. 352-355, 1998.
- WILSON JR., D.O., McDONALD JR., M.B. A convenient volatile aldehyde assay for measuring seed vigour. **Seed Sci. and Techn.**, v.14, n.2, p.259-268, 1986.

APÉNDICE

APÊNDICE A

Quadro 1 – Teste de Lillifors para as características plântulas normais no teste de germinação, plântulas normais no teste de envelhecimento acelerado (EA), plântulas anormais no teste de envelhecimento acelerado, índice de velocidade de emergência (IVE), porcentagem de emergência no quinto dia do IVE, teor de ácido linolênico, teor de lipídios e teor de aldeídos totais

Variáveis	Lillifors
Plântulas normais	0,16**
Envelhecimento acelerado (E.A.)	0,14**
Plântulas anormais (E.A.)	0,17**
Índice de velocidade de emergência (I.V.E.)	0,04 ^{n.s.}
Plântulas normais (Quinto dia – I.V.E.)	0,15**
Teor de ácido linolênico	0,27 ^{n.s.}
Teor de lipídios	0,17 ^{n.s.}
Teor de aldeídos totais	0,12 ^{n.s.}

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

Quadro 2 – Equações de regressão ajustadas para valores médios da porcentagem de germinação em $\text{arc sen } \sqrt{\%/100}$, nos “bulks” estudados, em função das épocas de colheita

“Bulks”	Médias	R ²
Com LOX Linolênico Normal	$\hat{Y} = 68,82$	-
Sem LOX Linolênico Baixo	$\hat{Y} = 85,6-9,61X+1,23 X^2$	0,49
Sem LOX Linolênico Normal	$\hat{Y} = 77,83$	-
Com LOX Linolênico Baixo	$\hat{Y} = 78,4-1,96X-0,85 X^2$	0,73

Quadro 3 – Equações de regressão ajustadas para valores médios da porcentagem de germinação obtidas no teste de envelhecimento acelerado em $\text{arc sen } \sqrt{\%/100}$, nos “bulks” estudados, em função das épocas de colheita

Material Genético	Equação	R ²
Com LOX Linolênico Normal	$\hat{Y} = 68,38+9,58X-4,32 X^2$	0,86
Sem LOX Linolênico Baixo	$\hat{Y} = 73,08+1,98X-1,58X^2$	0,78
Sem LOX Linolênico Normal	$\hat{Y} = 14,83+89,27 X -41,04 X^2+5,35 X^3$	0,70
Com LOX Linolênico Baixo	$\hat{Y} = 87,75+7,95X-5,25 X^2$	0,94

Quadro 4 – Equações de regressão ajustadas para valores médios de plântulas anormais obtidas no teste de envelhecimento acelerado em $\text{arc sen } \sqrt{\%/100}$, nos “bulks” estudados, em função das épocas de colheita

Material Genético	Equação	R ²
Com LOX Linolênico Normal	$\hat{Y} = 1,69+9,58X+9,36X^2$	0,81
Sem LOX Linolênico Baixo	$\hat{Y} = 1,0+4,75X$	0,41
Sem LOX Linolênico Normal	$\hat{Y} = 19,52$	-
Com LOX Linolênico Baixo	$\hat{Y} = 7,1+8,13X$	0,83

Quadro 5 – Equações de regressão ajustadas para valores médios do índice de velocidade de emergência em $\text{arc sen } \sqrt{\%/100}$, nos “bulks” estudados, em função das épocas de colheita

Material Genético	Equação	R ²
Com LOX Linolênico Normal	$\hat{Y} = 62,87+20,38X+5,35 X^2$	0,57
Sem LOX Linolênico Baixo	$\hat{Y} = 66,86$	-
Sem LOX Linolênico Normal	$\hat{Y} = 99,44-12,63 X +1,5 X^2$	0,74
Com LOX Linolênico Baixo	$\hat{Y} = 90,83-27,27X+3,91 X^2$	0,82

Quadro 6 – Equações de regressão ajustadas para valores médios da porcentagem de germinação obtidos no quinto dia no teste de índice de velocidade de emergência em $\text{arc sen } \sqrt{\%/100}$, nos “bulks” estudados, em função das épocas de colheita

Material Genético	Equação	R ²
Com LOX Linolênico Normal	$\hat{Y} = 41,75+25,42X-6,87 X^2$	0,47
Sem LOX Linolênico Baixo	$\hat{Y} = 8,50+6,20X$	0,55
Sem LOX Linolênico Normal	$\hat{Y} = 101,75-27,57X +3,6X^2$	0,55
Com LOX Linolênico Baixo	$\hat{Y} = 110,56-68,71X-11,19 X^2$	0,91

Quadro 7 – Equações de regressão ajustadas para valores médios dos teores de ácido linolênico, nos “bulks” estudados, em função das épocas de colheita

Material Genético		Equação	R ²
Com LOX	Linolênico Normal	$\hat{Y} = 0,14+9,92X-4,6 X^2+0,65 X^3$	0,89
Sem LOX	Linolênico Baixo	$\hat{Y} = 3,69$	-
Sem LOX	Linolênico Normal	$\hat{Y} = 4,03+0,061X$	0,27
Com LOX	Linolênico Baixo	$\hat{Y} = 7,22+0,20X-0,08X^2$	0,71