

MARIA FERNANDA ATTADEMO FURTADO

**INTROGREDINDO E VERIFICANDO ALELOS PARA ALTO OLEICO NA
QUALIDADE DO GRÃO DE SOJA E SUA INFLUÊNCIA NAS VIAS
DEPENDENTES DE ÁCIDO JASMÔNICO**

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

Orientador: Maximiller Dal Bianco Lamas Costa

Coorientador: Cleberson Ribeiro

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F992i
2022 Furtado, Maria Fernanda Attademo, 1993-
Introgredindo e verificando alelos para alto oleico na
qualidade do grão de soja e sua influência nas vias dependentes
de ácido jasmônico / Maria Fernanda Attademo Furtado. –
Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (38 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Referências bibliográficas: f. 36-38.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.581>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Soja - Melhoramento genético. 2. Enzimas. 3. Ácidos
graxos. I. Costa, Maximiller Dal-Bianco Lamas, 1981-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 631.52

MARIA FERNANDA ATTADEMO FURTADO

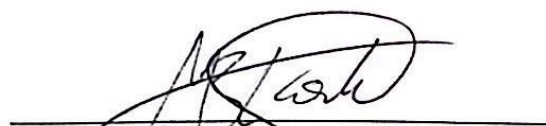
INTROGREDINDO E VERIFICANDO ALELOS PARA ALTO OLEICO NA
QUALIDADE DO GRÃO DE SOJA E SUA INFLUÊNCIA NAS VIAS
DEPENDENTES DE ÁCIDO JASMÔNICO

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

APROVADA: 30 de junho de 2022.

Assentimento:


Maria Fernanda Attademo Furtado
Autora


Maximilley Dal Bianco Lamas Costa
Orientador

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e dedicar essa dissertação às seguintes pessoas, que foram fundamentais para a obtenção desse título:

Aos meus pais Edson e Mara, às minhas irmãs Ana Elisa e Ana Carolina e aos meus sobrinhos: João Gabriel, Letícia e Guilherme pelo apoio e suporte incondicionais.

Agradeço meu noivo e parceiro Renan por acreditar nos meus objetivos e torcer sempre por mim.

Aos meus amigos e parceiros de laboratório: Terezinha, Jéssica, Brizza, Yan e Marina pelo aprendizado compartilhado.

Ao meu orientador Maximiller pela confiança depositada ao realizar essa pesquisa.

À minha amiga e roommate Letícia pela amizade e suporte. Agradeço também todos familiares e amigos que sempre torceram e acreditaram em mim.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

FURTADO, Maria Fernanda Attademo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2022. **Introgredindo e Verificando Alelos para Alto Oleico na Qualidade do Grão de Soja e sua Influência nas Vias Dependentes de Ácido Jasmônico.** Orientador: Maximiller Dal Bianco Lamas Costa. Coorientador: Cleberson Ribeiro.

O Brasil possui a maior produção de soja (*Glycine max*) do mundo, e seus atrativos como alto teor de óleo e proteína fazem do grão um dos produtos de maior interesse comercial. O grão de soja é composto de cerca de 20% de lipídeos – sendo 13% ácido palmítico, 4% ácido esteárico, 20% ácido oleico, 55% de ácido linoleico e 8% de ácido linolênico. A composição de ácidos graxos do grão determina a qualidade do óleo além de determinar características como: sabor, odor e valor nutricional. A principal meta no melhoramento da qualidade do óleo de soja tem sido o aumento de sua estabilidade oxidativa, reduzindo o teor de ácido linolênico e aumentando o teor de ácido oleico e isso pode ser feito utilizando metodologias de melhoramento genético e biologia molecular. Os genes FAD2-1A e FAD2-1B codificam as enzimas que controlam os níveis de ácido oleico no grão de soja, com isso, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver variedades de soja com alto oleico através de retrocruzamentos de linhagens melhoradas pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja (PQMS) com variedades promissoras comercialmente. Outro objetivo desse estudo foi verificar a relação entre os teores de ácido oleico na resposta a estresses nas vias de ácido jasmônico. Após confirmação da presença dos genes FAD2-1A e FAD2-1B nas linhagens do PQMS, foi selecionada variedade SUPREMA, com cerca de 85% de ácido oleico em sua composição para dar início aos cruzamentos e retrocruzamentos e avançando até a geração RC1 com resultados promissores e projeção de continuidade da introgressão completa dos alelos de alto oleico nesta variedade. Quanto a influência do teor de ácido oleico nas vias de jasmonato, foram analisados valores de expressão gênica dos genes OPR3 – específico na via do ácido jasmônico e HS1PRO1 – ligado à resistência de nematoide e usado para submeter a planta a condições de estresse. O experimento foi realizado no tempo de 1, 5 e 10 dias em plantas convencionais e plantas alto oleico e como resultado foi possível observar no gene OPR3, que as plantas alto oleico tem uma ativação maior no primeiro dia de experimento enquanto que a planta convencional apresenta uma ativação mais tardia, indicando que a baixa disponibilidade de ácido linolênico na planta alto oleico altera a quantidade de ácido jasmônico produzida naturalmente pela planta em condições de estresse. O gene HS1PRO1 na planta alto oleico teve uma expressão cerca de 15

vezes maior em condições de estresse. Em ambos os genes se observou que a nível transcricional há uma diferença entre as plantas convencionais e alto oleico, porém, são necessários outros experimentos para confirmar o resultado esperado.

Palavras-chave: Cruzamento. Expressão gênica. Jasmonato.

ABSTRACT

FURTADO, Maria Fernanda Attademo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June 2022 **Introgressing and Checking Alleles for High Oleic on Soybean Quality and Its Influence on Jasmonic Acid Dependent Pathways.** Advisor: Maximiller Dal Bianco Lamas Costa. Co-advisor: Cleberson Ribeiro.

Brazil has the world's largest soybean production (*Glycine max*), and its high oil and protein content make the grain products of greatest commercial interest. Soybean is composed of about 20% lipids – 13% palmitic acid, 4% stearic acid, 20% oleic acid, 55% linoleic acid, and 8% linolenic acid. The fatty acid composition of the grain determines the quality of the oil in addition to determining characteristics such as taste, odor, and nutritional value. The main goal in improving the quality of soybean oil has been to increase its oxidative stability, reduce the linolenic acid content, and increase the oleic acid content and this can be done using genetic improvement and molecular biology methodologies. The FAD2-1A and FAD2-1B genes encode enzymes that control the levels of oleic acid in the soybean grain, and the present work aims to develop soybean varieties with high oleic through backcrosses of improved lines by the Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja (PQMS) with commercially promising varieties. Another objective was to verify the relationship between the levels of oleic acid in the stress response in the jasmonic acid pathways. After confirming the presence of FAD2-1A and FAD2-1B genes in the PQMS lines, the SUPREMA variety was selected, with about 85% of oleic acid in its composition to start the crosses and advance to the RC1 generation. Regarding the influence of oleic acid content on jasmonate pathways, gene expression values of genes OPR3 – specific in the jasmonic acid pathway and HS1PRO1 – linked to nematode resistance and used to subject the plant to stress conditions were analyzed. The experiment was carried out at 1, 5, and 10 days in conventional plants and high oleic plants, and as a result, it was possible to observe in the OPR3 gene that the high oleic plants have a greater activation on the first day of the experiment while the conventional plant presents a later activation, indicating that the low availability of linolenic acid in the high oleic plant alters the amount of jasmonic acid naturally produced by the plant under stress conditions. The HS1PRO1 gene in the high oleic plant had an expression about 15 times higher under stress conditions. In both genes it was observed that at the transcriptional level there is a difference between conventional and high oleic plants, however, other experiments are necessary to confirm the observed result.

Keywords: Crossing. Gene expression. Jasmonate.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Biossíntese de ácido jasmônico. As caixas de texto indicam os intermediários de cada etapa. Esquema adaptado de: (ACOSTA et al., 2009) 14
- Figura 2:** Esquema do programa de retrocruzamento assistido da variedade (5035xSuprema 1) x UFVS77C10. 19
- Figura 3:** Genotipagem para os materiais alto oleico introgrididos em CS303TNKCA, M7110 IPRO, NA5909, SUPREMA e TMG4182. A - Genotipagem para o gene FAD2-1A, sendo possível identificar em verde, indivíduos heterozigotos e em vermelho, os indivíduos mutados. B - Genotipagem para o gene FAD2-1B, sendo destacado em verde os indivíduos mutados. 23
- Figura 4:** Análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa. Amostra 5035 x Suprema 1, onde:1: Início da corrida; 2: ácido palmítico; 3: ácido esteárico; 4: ácido oleico; 5: ácido linoleico e 6: ácido linolênico..... 24
- Figura 5:** Gel de agarose 1,2% para verificação de indivíduos transgênicos/convencionais. Primer RR1. M:marcador molecular; CT: controle transgênico; CC: controle convencional; CH: controle heterozigoto 26
- Figura 6:** Gráfico de expressão gênica para o gene JAR1. Onde SUPREMA são plantas convencionais e 6027: plantas com alto teor de ácido oleico; Tempos de experimento: 1, 5 e 10 dias. As amostras não foram avaliadas estatisticamente para este primer..... 28
- Figura 7:** Gráfico de expressão gênica para o gene OPR3, onde SUPREMA são plantas convencionais e 6027 são plantas com alto teor de ácido oleico. Tempos de experimento: 1, 5 e 10 dias. As amostras não apresentaram significância estatística para teste de Tukey. Marcado com * os tratamentos que apresentaram significância estatística entre si após realização do teste T..... 29
- Figura 8:** Gráfico de expressão gênica para o gene HS1PRO1. Onde SUPREMA são plantas convencionais e 6027 são plantas com alto teor de ácido oleico. Tempos de experimento: 1, 5 e 10 dias. As amostras que apresentaram significância estatística no teste de Tukey são legendadas com a e b, e médias significativas não compartilham mesma letra. Marcado com * os tratamentos que apresentaram significância estatística entre si após realização do teste T. 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Primers utilizados para detecção de genes transgênicos de soja e suas respectivas temperaturas de anelamento	17
Tabela 2: Variedades e linhagens desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento da Soja com características ideais para início do programa de retrocruzamentos	18
Tabela 3: Esquema delineamento experimental blocos inteiramente casualizados, totalizando 36 tratamentos, sendo 6027 variedade alto oleico.	20
Tabela 4: Primers utilizados para análise de expressão gênica	21
Tabela 5: Teor de ácidos graxos analisados por cromatografia gasosa para os indivíduos selecionados após genotipagem.....	24
Tabela 6: Nova nomenclatura adotada pelos indivíduos multiplicados e controle de florescimento – cor de flor e tempo médio para florescimento.	25
Tabela 7: Genótipos possíveis entre o grupo de indivíduos e sua devida proporção estatística	25
Tabela 8: Nomenclatura adotada para os cruzamentos após obtenção de F1.....	26

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.2	Objetivos Específicos	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	Cruzamentos e Retrocruzamentos.....	15
3.1.1	Material Vegetal	15
3.1.2	Extração de DNA	15
3.1.3	Seleção de Marcadores e Genotipagem	16
3.1.4	Fenotipagem.....	16
3.1.5	Avaliação de Organismos Geneticamente Modificados	17
3.1.6	Seleção dos recorrentes e avaliação dos descendentes	17
3.2	Avaliação de Expressão Gênica.....	19
3.2.1	Material Vegetal	19
3.2.2	Delineamento Experimental	19
3.2.3	Extração de RNA	20
3.2.4	Análise de genes para qRT-PCR.....	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1	Cruzamentos e Retrocruzamentos.....	23
4.2	Avaliação de Expressão Gênica.....	28
5	CONCLUSÕES	35
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é uma das principais culturas brasileiras e sua produção têm aumentado ao longo dos anos. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), estima-se que a safra de grãos 2021/22 poderá atingir um total de 269,3 milhões de toneladas, o que representa 5,4% ou 13,8 milhões de toneladas superior à obtida na safra 2020/21 (CONAB, 2022).

O farelo e o óleo de soja são os principais subprodutos da soja, sendo o farelo altamente proteico e utilizado para diversos fins, dentre eles, alimentação animal. A exportação de óleo de soja do Brasil em 2022 foi estimada em 1,8 milhão de toneladas no mês de maio, 100 mil acima da previsão dada em abril do mesmo ano, sendo esse o maior nível desde 2008 (ABIOVE 2022).

Os principais atrativos para a produção de soja são seus altos teores de óleo e proteína, além de ser considerada uma boa fonte de minerais como ferro, potássio, magnésio, zinco, cobre, fósforo, manganês e vitaminas do complexo B, além de conter isoflavonas, saponinas, fitatos, fitoesteróis, peptídeos de baixo peso molecular, sacarose e ácidos graxos poliinsaturados (CARRÃO-PANIZZI et al., 2009).

O óleo de soja é composto basicamente por triglicerídeos dos seguintes ácidos graxos: 13% de ácido palmítico (16:0); 4% de ácido esteárico (18:0); 20% de ácido oleico (18:1 Δ^9); 55% de ácido linoleico (18:2 $\Delta^9,12$); 8% de ácido linolênico (18:3 $\Delta^9,12,15$) (GOETTEL et al., 2014; ZHANG et al., 2018)

A proporção de ácidos graxos e suas características físico-químicas, como ponto de fusão e estabilidade oxidativa são fatores determinantes para avaliação da qualidade do óleo de soja (FEHR, 2007). Teores elevados de ácidos poli-insaturados (ácidos linoleico e linolênico) são responsáveis pela alta instabilidade oxidativa do óleo de soja, pois podem sofrer rancificação e assim alterar o sabor, odor e diminuir o tempo de armazenamento do produto final (WARNER; FEHR, 2008).

Para reduzir os teores de ácidos graxos poli-insaturados, o óleo de soja passa por um processo de hidrogenação química, porém, este processo leva à formação de 10-40% de ácidos graxos trans, moléculas cujo consumo tem sido associado ao aumento do risco de diabetes e doenças coronárias (MOZAFFARIAN et al., 2006; ZALOGA et al., 2006). Devido a este fator, um dos objetivos dos programas de melhoramento de soja é o aumento da estabilidade oxidativa do óleo por meio da redução do teor de ácido linolênico e aumento do ácido oleico, uma

alternativa mais saudável à hidrogenação (PHAM et al., 2010; PHAM; SHANNON; BILYEU, 2012)

A biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados em sementes de soja envolve as enzimas ácido graxo dessaturases (no inglês *fatty acid desaturases* – FAD), principalmente as do retículo endoplasmático (microsoma). A enzima ω 6-dessaturase converte oleoil em linoleoil, enquanto a ω 3-dessaturase é responsável pela conversão de linoleoil em linolenil (ZHANG et al., 2018).

Os genes GmFAD2-1A (Glyma.10g278000) e GmFAD2-1B (Glyma.20g111000) são expressos em sementes de soja no processo de desenvolvimento do grão, e codificam as ω 6-dessaturases que controlam os níveis de ácido oleico, enquanto os três genes GmFAD3 [GmFAD3A (Glyma.14g194300), GmFAD3B (Glyma.02g227200) e GmFAD3C (Glyma.18g062000)] contribuem para o conteúdo de ácido linolênico, e são expressos em vários tecidos, incluindo sementes em desenvolvimento (BILYEU et al., 2003).

Os retrocruzamentos permitem a transferência de um ou poucos genes de um doador para o genitor recorrente, que geralmente é um cultivar ou material elite de grande interesse. Por meio desta técnica é possível desenvolver uma nova planta, semelhante ao genitor recorrente na maioria das características, mas com fenótipo melhorado para a característica alvo (SILVA, 2017).

A introgressão de genes feita apenas por retrocruzamentos é baseado em características fenotípicas da planta, que podem ser facilmente influenciadas por condições ambientais. Como alternativa para otimizar esse processo, são utilizados marcadores moleculares de DNA, que são quais fenótipos moleculares advindos de um gene/segmento específico que estejam ligados aos genes envolvidos no fenótipo de interesse (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Existem diversos tipos de marcadores para realização da técnica, tais como *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), Poliformismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP), Microsatélites (SSR) e Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP), que tem sido utilizado em maior escala nos últimos anos (SOUZA, 2019).

Os marcadores do tipo SNP são caracterizados pela presença de um único par de base nitrogenada diferente em um fragmento de DNA homólogo entre os indivíduos. Existe um grande número desse tipo de marcador empregados em soja e eles podem ser identificados de diferentes formas, como hibridização, sequenciamento direto com comparação de fragmentos das moléculas de DNA e via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (BARROS e SOUZA, 2012).

Os SNPs são geralmente identificados por comparação de DNA mutado com regiões conhecidas ou DNA de tipo selvagem, e a análise de sequência é realizada pela amplificação

de regiões do tipo selvagem conhecidas do DNA que afetam características de interesse (DARR et al., 2020).

A combinação de mutações nos genes GmFAD2-1 e GmFAD3 possibilita o desenvolvimento de soja com altos teores de ácido oleico (acima de 80%) e baixos teores de ácidos graxos poli-insaturados, valores comparáveis ao azeite de oliva, considerado o óleo vegetal mais saudável (PHAM et al., 2010; PHAM; SHANNON; BILYEU, 2012; ROSS et al., 2000).

O melhoramento genético é uma alternativa para a produção de óleo com maior estabilidade oxidativa e qualidade nutricional, tendo aplicação direta nas indústrias de alimentos e combustível. Empresas como Monsanto e Dupont Pioneer desenvolveram as variedades Vistive® Gold e Plenish®, respectivamente, com alto teor de ácido oleico e baixo teor de ácido linolênico utilizando biotecnologia, e elas já estão liberadas para cultivo e importação em alguns países.

O mercado interno brasileiro apresenta grande defasagem em variedades que apresentem estas características desenvolvidas por métodos convencionais de melhoramento. Para tal, o método dos retrocruzamentos assistidos por marcadores (RAM), têm-se apresentado como estratégia promissora para produzir novas cultivares de soja, introgredindo as características de interesse que vem ganhando destaque comercial nos últimos anos.

O ácido jasmônico (AJ) pertence a uma classe de substâncias naturais, classificadas como fito-hormônios. Tanto ele quanto seus derivados – jasmonatos – estão relacionados a mecanismos de defesa vegetal, dentre eles indução de genes relacionados à defesa ao ataque de herbívoros e injúrias. O ácido jasmônico é formado através da rota octadecanóide no peroxissomo, e quando liberado no citoplasma forma o metil jasmonato, que age como sinalizador, ativando a transcrição de genes de defesa no núcleo da célula e de células vizinhas (WEBER, 2002).

A biossíntese do ácido jasmônico é um processo complexo e requer três compartimentos celulares e diversos intermediários, conforme mostra a Figura 1. O primeiro passo ocorre no cloroplasto, onde o ácido linolênico (C18:3) é libertado a partir dos lipídeos da membrana através da atividade da fosfolipase A1 (PLA1). Em seguida, a enzima 13-lipoxigenase (13-LOXs) é responsável pela oxidação do ácido linolênico e sintetiza o primeiro intermediário, o ácido 13-hidroperóxido linolênico. Posteriormente há uma ação sequencial das enzimas óxido sintase de aleno (AOS) e óxido ciclase de aleno (AOC) onde é sintetizado a molécula ácido cis-12-oxo-fitodienóico (OPDA). Por fim, o OPDA é transportado para o peroxissoma, onde sofre redução pela 12-oxofitodietonato redutase 3 (OPR3) e posteriormente, o intermediário formado

sofre beta-oxidações, reduzindo a cadeia para obtenção do ácido jasmônico. Após a síntese do JA, este metabólito é exportado para o citoplasma para ser conjugado com o aminoácido isoleucina por ação da enzima jasmonato amino sintetase (JAR1), resultando na forma bioativa ácido jasmônico com isoleucina (JA-Ile) (MARQUES, 2015; SECATTO, 2013).

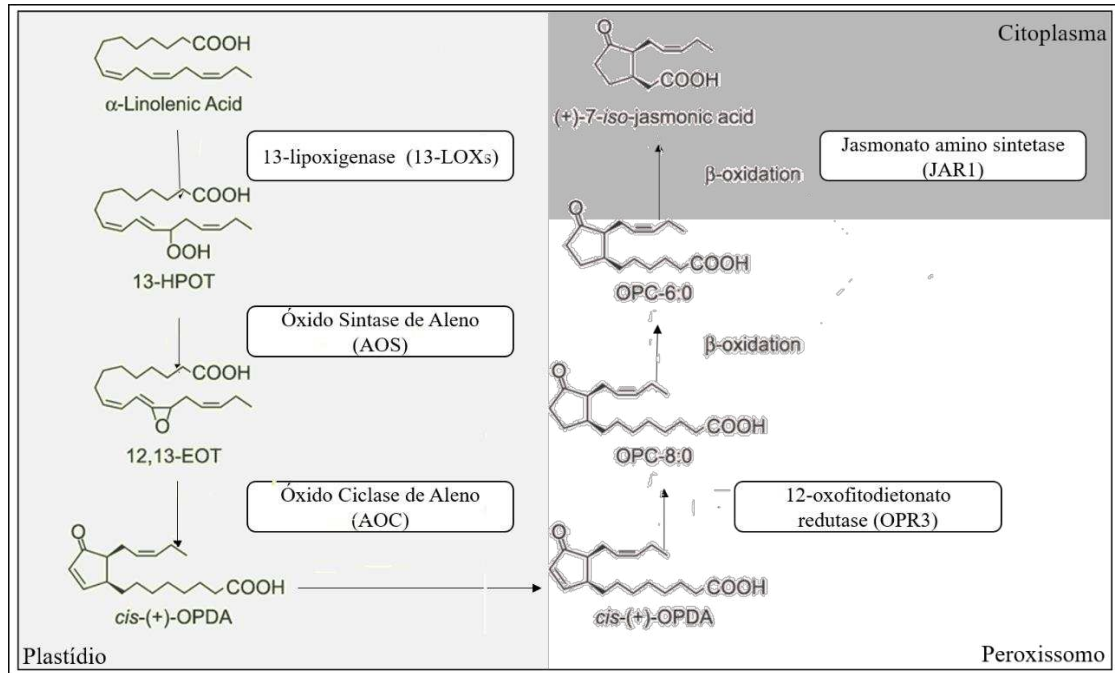


Figura 1: Biossíntese de ácido jasmônico. As caixas de texto indicam os intermediários de cada etapa. Esquema adaptado de: (ACOSTA et al., 2009)

Para que haja síntese de ácido jasmônico é essencial a presença de ácido linolênico e, por esta razão, plantas com maior concentração desta substância podem apresentar maior eficiência no sistema sinalizador com JA, aumentando a tolerância aos estresses (HOWE et al., 2000).

O aumento de ácido oleico e redução de ácido linolênico abre vertentes para diversas discussões, dentre elas a relação na síntese de ácido jasmônico nas plantas, visto que o ácido jasmônico é formado a partir do ácido linolênico. Não se tem evidência na literatura da relação de alto oleico e baixo linolênico com a redução da síntese de jasmonato ou de alterações nos mecanismos de defesa da planta. Portanto, o objetivo deste trabalho é introgridir alelos para alto oleico em variedades que vêm ganhando destaque comercial no Brasil nos últimos anos, além de analisar a influência desta característica nas vias de sinalização dependentes de ácido jasmônico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver variedades de soja de interesse comercial com alto teor de ácido oleico e verificar se isto influencia na resposta a estresses nas vias de sinalização dependentes do ácido jasmônico.

2.2 Objetivos Específicos

- Validar os marcadores associados ao alto teor de oleico, presentes na literatura;
- Verificar a presença de genes transgênicos nas variedades desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja (BIOAGRO/DBB/UFV);
- Prosseguir com programas de retrocruzamentos para a introgressão dos alelos – para alto teor de oleico – em variedades promissoras;
- Avaliar expressão de genes de resistência a nematoide e genes presentes na via de ácido jasmônico comparativamente em variedades comerciais e alto oleico;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cruzamentos e Retrocruzamentos

3.1.1 Material Vegetal

Os materiais utilizados são provenientes de retrocruzamentos feitos anteriormente utilizando o acesso PL04 (cerca de 80% de ácido oleico) e diferentes variedades de soja que foram utilizadas como genitores recorrentes: CS303TNKCA (BIOAGRO/DBB/UFV), M7110 IPRO (Monsanto), NA5909 (Nidera) e TMG 4182 (Tropical Melhoramento e Genética).

3.1.2 Extração de DNA

Folhas jovens e sadias de soja em estágio vegetativo (V2) foram coletadas e armazenadas em freezer -80°C; a extração de DNA foi realizada utilizando protocolos Doyle e Doyle (1990) ou King e colaboradores (2014). As amostras extraídas foram quantificadas por meio do espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). A qualidade do DNA foi atestada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Posteriormente foi realizada diluição para a concentração de trabalho de $15 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ para a genotipagem.

3.1.3 Seleção de Marcadores e Genotipagem

O processo de introgressão dos genes GmFAD2-1A e GmFAD2-1B nas variedades descritas na sessão “Materiais Vegetais” a partir da PL04 foi realizada utilizando marcadores HRM (SILVA,2017). Estes marcadores têm grau de confiança mais baixo quando comparado com outras metodologias, como Taqman e KASP. Entretanto, já há descrito na literatura o uso de metodologia KASP para estes genes, portanto foi escolhido este sistema para introgressão nos novos cultivares (PATIL et al., 2017).

A genotipagem seguiu a metodologia KASP™ (LGC Genomic, 2003), executada no equipamento Real Time PCR 7500 Systems (Applied Biosciences). A reação de amplificação compreendeu 1 ciclo de 94°C por 15 minutos; 10 ciclos de 94°C por 20 segundos, com gradiente de $61-55^{\circ}\text{C}$, decaindo $0,6^{\circ}\text{C}$ a cada 60 segundos; 30 ciclos de 94°C por 20 segundos e 55°C por 60 segundos; e um ciclo de 37°C por 60 segundos. Cada reação consistiu em $2,5\mu\text{L}$ de DNA a $15\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$, $2,5\mu\text{L}$ de 2x Master Mix e $0,07\mu\text{L}$ de Primer Mix. A discriminação alélica foi executada no software AB 7500 Software v.2.3.

3.1.4 Fenotipagem

O teor de ácidos graxos das sementes de soja foi avaliado seguindo a metodologia adaptada de Gesteira et al. (2003). O protocolo consiste nas etapas: 15mg de sementes trituradas em nitrogênio líquido são colocadas em tubos de vidro de tampa rosqueável juntamente com 1mL de hexano. Posteriormente, as amostras são borbulhadas usando nitrogênio, agitadas em vórtex e acondicionadas a 4°C por 16 horas. Após este intervalo, a solução é transferida para um novo tubo, evaporada com nitrogênio líquido e em seguida adiciona-se 0,4mL de metóxido de sódio 1M; submete-se a solução a agitação em vórtex seguido de banho-maria a 30°C por 1h. Passado este tempo, adiciona-se 1mL de água mili-Q® e 1mL de hexano, agita-se a solução em vórtex e acondiciona à temperatura ambiente por 1h. Por fim, a fase orgânica (sobrenadante) é coletada para novo tubo, adicionada a sulfato de sódio anidro, e transferida para tubos de injeção.

A composição de ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa no equipamento Shimadzu GC-2010 Plus, conforme descrito por Burkey et al. (2007). O conteúdo de ácidos

graxos nas amostras foi determinado como uma proporção do total de ácidos graxos, representado em % de óleo.

3.1.5 Avaliação de Organismos Geneticamente Modificados

Para avaliação do DNA dos materiais quanto a presença de transgenes é realizada PCR em volume de 15µL, sendo 2,0µL de DNA diluído na concentração 15 µgµL⁻¹, 1,5 µL de 10x PCR Rnx Buffer (Invitrogen), 1,5µL de dNTP 2,5mM, 1,0µL de cada primer 10mM e quantidade variável entre 6,0µL e 6,2µL de água mili-Q® (de acordo com o primer) e entre 0,7µL e 0,9µL de MgCl 50mM (de acordo com o primer). Por fim, adiciona-se 0,1µL de Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). As condições de reação são: 94 °C por 3 minutos; 40 ciclos iniciados a 94 °C por 30 segundos, temperatura específica de anelamento do *primer* por 30 segundos, e 72 °C por 1 minuto. Por fim, os produtos passam por um gradiente de temperatura de 72°C por 10 minutos até atingir a temperatura final de 4°C.

Na Tabela 1 estão dispostos os genes transgênicos analisados e o trio de primers, assim como a temperatura de anelamento (Tm).

A verificação dos indivíduos convencionais e/ou transgênicos é feito por padrão em gel de agarose 1,2%.

Tabela 1: Primers utilizados para detecção de genes transgênicos de soja e suas respectivas temperaturas de anelamento

Genes Transgênicos	Primers	Tm (°C)
RR1	RR1Rv	60°C
	FwRR1-1	
	RR1 – F	
RR2	Fw89 New	66°C
	Trans 89Rv New	
	Codo 8 Rv New	
Bt	MON 87Fw	60°C
	MON 87Rv	
	MON 87701-primer1	

3.1.6 Seleção dos recorrentes e avaliação dos descendentes

Foi realizado um levantamento das linhagens em desenvolvimento do nosso programa de melhoramento com melhor desempenho e ciclo precoces em campo nos últimos anos e buscou-se aquelas com características complementares às linhagens alto oleico desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja (BIOAGRO/DBB/UFV), conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Variedades e linhagens desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento da Soja com características ideais para início do programa de retrocruzamentos

Variedades	Cor de Flor
5027 x TMG 4182.3	Branca
5027 x TMG4182.4	Branca
RC4-Cs-07-27	Roxa
5035 x Suprema1	Branca/Roxa
UFV – MB	Roxa
UFVS77C10	Branca

A variedade UFVS77C10 é uma variedade registrada resultado do melhoramento ao longo dos anos pelo programa e tem como principal característica, ciclo precoce, ausência de gene transgênico e alta produtividade no estado de Mato Grosso. Já a linhagem UFV-MB ainda está em desenvolvimento pelo programa, mas com alto potencial produtivo, maior teor proteico e resistência a nematoides. Dessa forma, os cruzamentos foram definidos utilizando cor de flor para facilitar a seleção. Para o presente trabalho foi definido o cruzamento entre a linhagem alto oleico 5035xSuprema 1 (flor roxa) com a variedade UFVS77C10 (flor branca), conforme ilustrado na Figura 2.

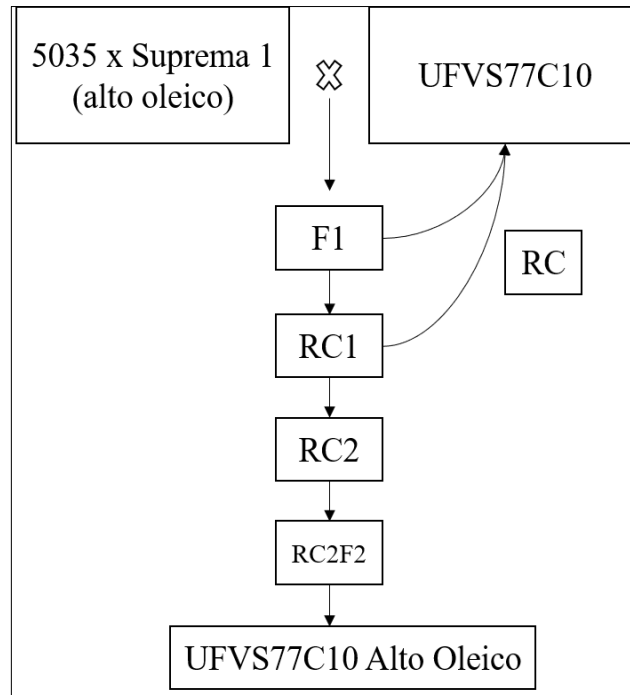


Figura 2: Esquema do programa de retrocruzamento assistido da variedade (5035xSuprema 1) x UFVS77C10.

3.2 Avaliação de Expressão Gênica

























3.2.1 Material Vegetal

Foi selecionada a variedade SUPREMA e a linhagem 6027 (RC5:F2 de SUPREMA), que possui alto teor de ácido oleico para comparação do perfil transcricional. A escolha destes materiais se deu por não possuir resistência ao nematoide de cisto da soja (NCS) e pela linhagem 6027 possuir 86,26% de ácido oleico em sua composição.

3.2.2 Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizado, avaliando quatro tratamentos – inoculado e não inoculado/convencional e alto oleico, três repetições biológicas e intervalos de 1, 5 e 10 dias de inoculação, totalizando 36 ensaios, conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3: Esquema delineamento experimental blocos inteiramente casualizados, totalizando 36 tratamentos, sendo 6027 variedade alto oleico.

	6027		SUPREMA	
	Controle	Inóculo	Controle	Inóculo
1 dia				
				
5 dias				
				
10 dias				
				

O experimento foi realizado em casa de vegetação num intervalo total de 20 dias. As sementes foram germinadas em bandejas, utilizando o substrato comercial Plantmax® e após 9 dias foram plantadas individualmente em vasos plásticos com capacidade de 500mL previamente higienizados. Os materiais controle foram plantados utilizando solo autoclavado e os materiais inoculados foram plantados em mistura de 2:1 de solo autoclavado e solo contaminado com nematoide de cisto da soja (NCS) - *Heterodera glycines*.

Nos tempos 1, 5 e 10 dias, foram coletados raiz e folha dos materiais e armazenados em freezer -80°C para posterior extração de RNA.

3.2.3 Extração de RNA

Foi realizada a extração do RNA de raiz utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Após a extração, a quantificação foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). A qualidade do RNA foi verificada pela integridade de bandas em gel de agarose 1,7%.

Posteriormente as amostras de RNA foram submetidas a tratamento com DNase I Amplification Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e posterior reação com Transcriptase Reversa MMLV (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) utilizando primer Oligo (dT)12-18 (Sigma Aldrich, São Paulo, SP) para a síntese da fita de cDNA, que corresponde ao DNA complementar ao RNA mensageiro.

3.2.4 Análise de genes para qRT-PCR

Os genes de controle endógeno CYP e UKN2 foram selecionados de acordo com os resultados obtidos e validados em Silva e colaboradores (2022). Os genes OPR3 e JAR1 foram avaliados devido sua presença na via de síntese do ácido jasmônico, e o gene HS1PRO1 foi avaliado devido sua relação com resistência a nematoides. Os genes e primers escolhidos são utilizados e validados em soja e estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4: Primers utilizados para análise de expressão gênica

Glyma	Gene	Primer	Referência
Glyma.12g024700	CYP	F: ACGACGAAGACGGAGTGG R: CGACGACGACAGGCTTGG	(LI et al., 2012)
Glyma.06g038500	UKN2	F: GCCTCTGGATACCTGCTCAAG R: ACCTCCTCCTCAAACCTCCTCTG	(HU et al., 2009)
Glyma.13g109700	OPR3	F: AGTGAGCAAAGGAGCCAAGG R: CAGCTTGCAGGCAATATAGATGA	(SELIG et al., 2016)
Glyma.16g03010.1	JAR1	F: ACACCAAGATTCTCCTAGCTGC R: AGGATCCGTCCTCCCATTC	(SELIG et al., 2016)
Glyma.02g25540	HS1PRO1	F: TCACGCCGCACCTTCTGT R: TGAGTTGAGGAAGACGGAGATAGTAG	(Morales, 2009)

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em equipamento 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), utilizando 1µL do cDNA sintetizado diluído 1:10, 4µL do primer Forward misturado com o primer Reverse na concentração de 1,5µM (cada primer) e 6µL de SYBR Green PCR Master Mix, sendo três réplicas biológicas de cada genótipo e duas réplicas técnicas para cada réplica biológica. O ciclo para as reações de PCR em tempo real foi: 95°C por 10 min e 40 ciclos de: desnaturação 95°C por 15s, seguido de anelamento e extensão a 60°C por 1 min. A especificidade dos produtos amplificados foi analisada pelas curvas de dissociação geradas pelo equipamento. Foram utilizados controles negativos sem a adição de cDNA sintetizado e/ou primers para confirmar a ausência de qualquer tipo de contaminante no meio reacional (No Template Control, NTC).

Os resultados obtidos foram analisados seguindo modelo descrito por Hellemans e colaboradores (2007). Foi realizada uma análise de variância ANOVA, teste de comparação das médias Tukey e Teste t de Student no software GraphPad Prism 8.0.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cruzamentos e Retrocruzamentos

Sementes dos materiais provenientes dos retrocruzamentos feitos anteriormente por Silva (2017), utilizando o acesso PL04 e as variedades de soja CS303TNKCA, M7110 IPRO, NA5909, SUPREMA e TMG 4182, foram germinadas em casa de vegetação. Amostras de folha foram coletadas para extração de DNA e posterior genotipagem para os marcadores GmFAD2-1A e GmFAD2-1B. Os genes FAD2-1A e FAD2-1B são recessivos na herança e o resultado da genotipagem é apresentado na Figura 3.

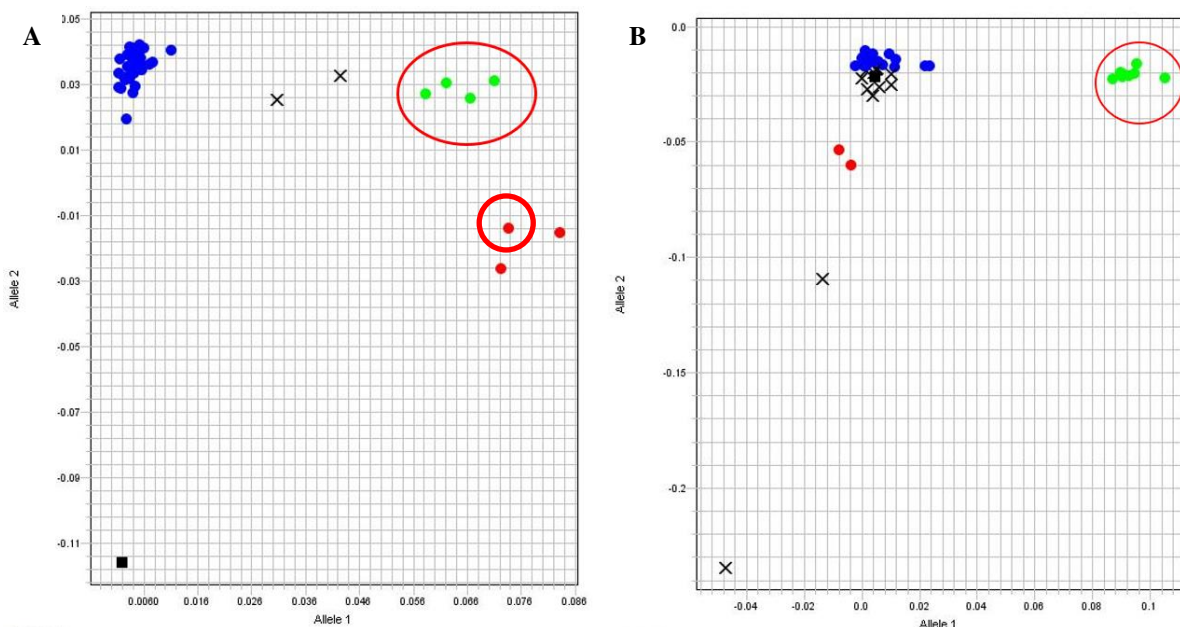


Figura 3: Genotipagem para os materiais alto oleico introgridos em CS303TNKCA, M7110 IPRO, NA5909, SUPREMA e TMG4182. A - Genotipagem para o gene FAD2-1A, sendo possível identificar em verde, indivíduos heterozigotos e em vermelho, os indivíduos mutados. B - Genotipagem para o gene FAD2-1B, sendo destacado em verde os indivíduos mutados.

Analisando os resultados das genotipagens, apenas os indivíduos heterozigotos ou homozigotos recessivos para FAD2-1A e FAD2-1B são de interesse para iniciar um programa de retrocruzamento para aumentar o conteúdo de oleico. Por este motivo, descartou-se os indivíduos homozigotos dominantes (AA) e selecionou-se os indivíduos homozigotos recessivos (aa) e heterozigotos (Aa) para o marcador GmFAD2-1A. Para o marcador GmFAD2-1B, selecionou-se apenas os indivíduos homozigotos recessivos (bb).

O presente trabalho tem como foco o desenvolvimento de materiais comerciais a partir da linhagem SUPREMA, e por este motivo foi selecionado como doador a linhagem

5035xSuprema 1, que é heterozigoto para o marcador GmFAD2-1A e mutado para o marcador GmFAD2-1B (Aabb).

Conforme citado por Willete et al (2021), o efeito aditivo dos alelos mutados FAD2-1A e FAD2-1B é maior que o efeito de cada alelo individual, com a mutação de FAD2-1A contribuindo com maior efeito na quantidade de ácido oleico. Portanto, a linhagem selecionada passará por um número de retrocruzamentos para a introgressão do fenótipo na cultivar UFVS77C10, e posterior autofecundação para fixar a mutação e assim, alcançar o efeito aditivo dos dois alelos.

Para avaliar o efeito da mutação e comprovar o teor de ácido oleico (18:1 Δ^9), o genótipo 5035 x Suprema 1 foi submetido a análise de ácidos graxos, e o resultado da análise pode ser verificado na Tabela 5 e na Figura 4.

Tabela 5: Teor de ácidos graxos analisados por cromatografia gasosa para os indivíduos selecionados após genotipagem

Indivíduos	Teor de Ácidos Graxos (%)				
	Palmítico o (16:0)	Estearíco (18:0)	Oleico (18:1 Δ^9)	Linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$)	Linolênico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$)
5035 x Suprema 1	6,72	3,09	85,95	2,44	1,77

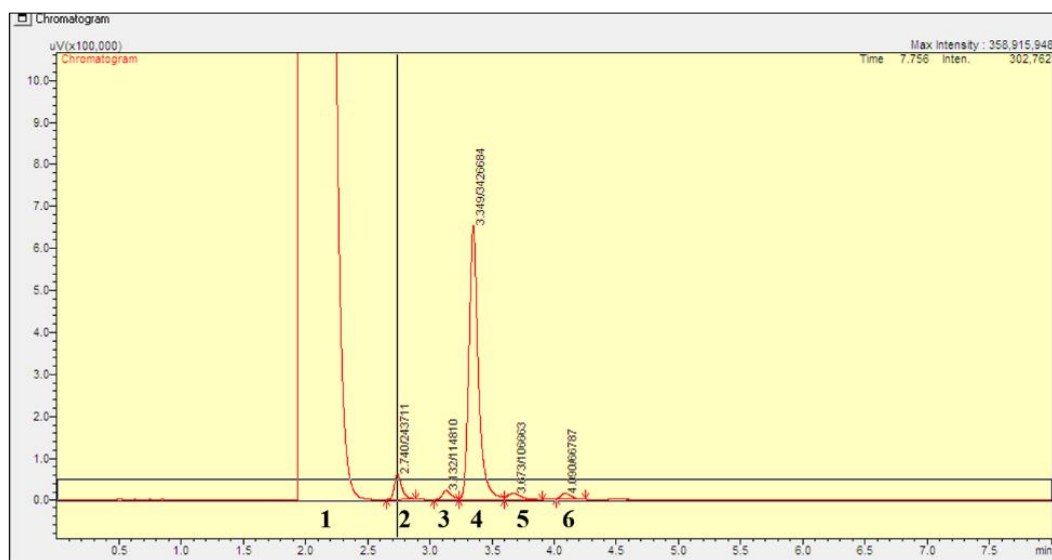


Figura 4: Análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa. Amostra 5035 x Suprema 1, onde: 1: Início da corrida; 2: ácido palmítico; 3: ácido estearíco; 4: ácido oleico; 5: ácido linoleico e 6: ácido linolênico.

Embora não exista um padrão oficial de perfil de ácidos graxos para soja alto oleico, os óleos de soja alto oleico comercializados nos Estados Unidos possuem cerca de 75% ou mais de ácido oleico. Outras alterações também estão presentes, tais como redução significativa dos

ácidos linoleico e linolênico a um teor menor que 3%, além da redução também do ácido palmítico (U.S. SOYBEAN EXPORT COUNCIL, 2021)

O indivíduo 5035 x Suprema 1 apresentou um percentual elevado para ácido oleico, de 85,95%, resultado encontrado quando se há mutação nos dois alelos FAD2-1A e FAD2-1B. O teor de ácido oleico no grão de soja é uma característica em que a influência do ambiente e outros genes envolvidos no controle da característica justifica em parte o teor encontrado (BACHLAVA et al., 2009). Além disso, há a possibilidade de erro na identificação dos genótipos.

Devido ao número insuficiente de sementes do genótipo 5035 x Suprema 1 para prosseguir com os cruzamentos previstos, foi realizada multiplicação em casa de vegetação, resultando em 17 novos indivíduos. Otimizando esta etapa, foi feito o controle de florescimento – cor de flor e dias para florescimento, além de adotar nova nomenclatura destes indivíduos em uma sequência numérica, visando melhor identificação. O controle de florescimento e a nova identificação dos indivíduos podem ser vistos na Tabela 6.

Tabela 6: Nova nomenclatura adotada pelos indivíduos multiplicados e controle de florescimento – cor de flor e tempo médio para florescimento.

Indivíduos	Nova Identificação	Cor de Flor	Tempo médio de florescimento
5035 x Suprema 1.1 a	6019 a 6035	Branca e Roxa*	47 dias
5035 x Suprema 1.17			

* Foi feita a identificação individual por cor de flor, sendo cinco de flor branca e doze de flor roxa.

Os novos indivíduos, ao passarem pela etapa de multiplicação, foram submetidas a autofecundação, alterando a proporção estatística dos genes, mostrado na Tabela 7.

Tabela 7: Genótipos possíveis entre o grupo de indivíduos e sua devida proporção estatística

Indivíduos	Genótipos possíveis	Proporção estatística
6019 a 6035	AAbb	1:2:1
	Aabb	
	aabb	

Visando preservar características adotadas no mercado, foi realizada a extração de DNA desses materiais e PCR para confirmar a ausência de gene transgênico utilizando os primers RR1, RR2 e Bt. A Figura 5 é resultado do primer RR1, os demais primers apresentaram mesmo

padrão de banda, comprovando que todos os indivíduos de 6019 a 6035 são convencionais e com ausência de genes transgênicos.



Figura 5: Gel de agarose 1,2% para verificação de indivíduos transgênicos/convencionais. Primer RR1. M: marcador molecular; CT: controle transgênico; CC: controle convencional; CH: controle heterozigoto

Após confirmação de que todos os indivíduos não contêm transgenia, conforme já esperado para os indivíduos derivados de SUPREMA, se deu início a etapa de cruzamento utilizando como recorrente a linhagem UFVS77C10 (6035 x UFVS77C10), dando origem à F1.

A obtenção de soja alto oleico por métodos convencionais é uma iniciativa pouco empregada no mercado atualmente, sendo este, um diferencial. Nos últimos anos, há uma grande procura por farelo de soja com alto teor de oleico e não transgênico para alimentação animal nos Estados Unidos, e há uma tendência para que o mercado brasileiro siga as mesmas orientações nos próximos anos (U.S. SOYBEAN EXPORT COUNCIL, 2021)

Para otimizar a identificação e o número de cruzamentos e retrocruzamentos, os indivíduos, após obtenção de F1, foram nomeados seguindo o usual pelo PMQS conforme mostrado na Tabela 8.

Tabela 8: Nomenclatura adotada para os cruzamentos após obtenção de F1.

Cruzamento	Nomenclatura	Número de Sementes
6035 x UFVS77C10	DSF65 – F1	22

Os indivíduos da geração F1 foram retrocruzados com as variedades recorrentes UFVS77C10. Sabe-se que o diagnóstico de F1 é uma etapa limitante para a continuidade nos retrocruzamentos, neste momento a busca pelos indivíduos heterozigotos é a chave para a introgressão dos alelos de alto oleico.

A estimativa dos retrocruzamentos da linhagem 6035 (alto oleico) com a variedade UFVS77C10 é chegar à geração RC2 e em seguida uma ou duas gerações de autofecundação

para conseguir indivíduos homozigotos mutados para os dois marcadores, tendo em vista que ambos os indivíduos envolvidos no processo são convencionais.

4.2 Avaliação de Expressão Gênica

Para avaliar a relação entre a soja com alto teor de ácido oleico nas vias dependentes de jasmonato foram selecionadas as linhagens 6027 (RC5:F2 de SUPREMA) e a variedade SUPREMA convencional como controle desta variável. A escolha dos genes avaliados foi baseada na etapa de biossíntese de ácido jasmônico, as enzimas 12-oxofitodietonato sintetase (OPR3) e jasmonato amino sintetase (JAR1) participam ativamente na obtenção do ácido jasmônico em sua forma ativa.

Para que ocorra a síntese de ácido jasmônico, a planta deve ser submetida a algum estresse, tal como estresse hídrico, ataque de insetos ou injúrias. Portanto, parte dos materiais foi inoculado em solo contaminado com o nematoide de cisto da soja *Heterodora glycines*. Os nematoides do cisto de soja são vermes parasitas que infectam a raiz da planta e podem acumular no solo por anos, portanto, foram escolhidos por fornecerem estresse à planta.

Além dos genes OPR3 e JAR1, presentes ativamente na síntese de ácido jasmônico, foi avaliado o gene HS1PRO1, pois ele está relacionado com a resposta da planta ao ataque de nematoide, e os genótipos avaliados são suscetíveis ao ataque destes parasitas.

O resultado de expressão gênica de JAR1 pode ser visto no gráfico da Figura 6 e observa-se que, com exceção do material SUPREMA tratado com nematoide (I) no tempo de 10 dias, não houve variação nos valores de expressão ao longo dos dias e nos diferentes tratamentos submetidos.

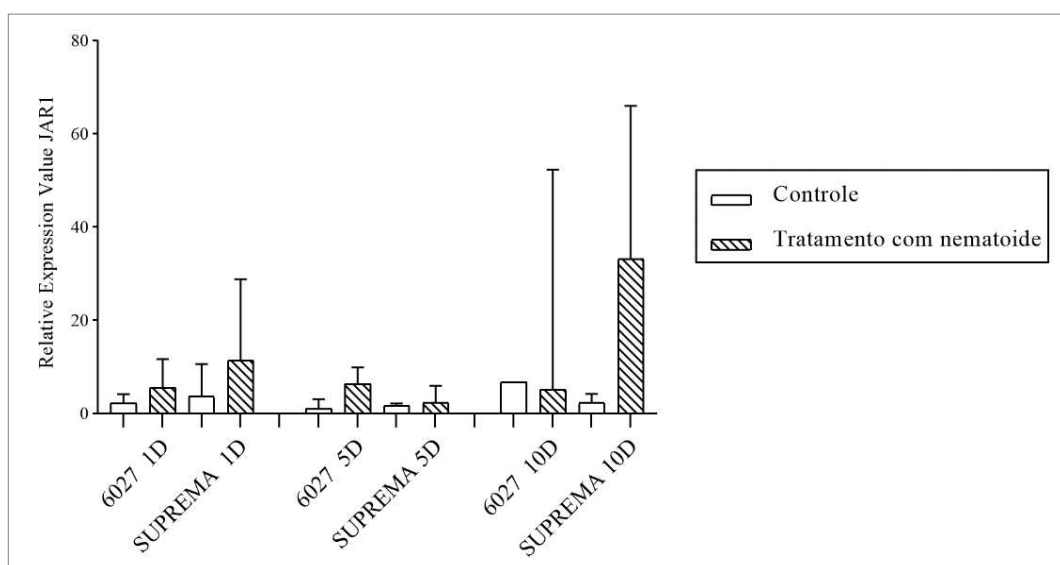


Figura 6: Gráfico de expressão gênica para o gene JAR1. Onde SUPREMA são plantas convencionais e 6027: plantas com alto teor de ácido oleico; Tempos de experimento: 1, 5 e 10 dias. As amostras não foram avaliadas estatisticamente para este primer.

Ao analisar este resultado e compará-lo com outros desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, foi detectado a baixa viabilidade deste primer, visto que é um primer de grande amplicon (208pb) e pouca especificidade, e apesar de ser um primer bastante difundido na literatura não teve o desempenho esperado.

Os genes de biossíntese de ácido jasmônico são membros de famílias gênicas e existe uma especificidade entre um gene específico e a sua síntese. Para o gene 12-oxofitodietonato redutase (OPR), existem a OPR1, OPR2 e OPR3, sendo o gene OPR3 o mais específico para a via de biossíntese de jasmonato e responsável pela redução do ácido oxo-fitodienólico (OPDA) (MATSUI et al., 2004). O gráfico de expressão gênica para o gene OPR3 pode ser verificado na Figura 7.

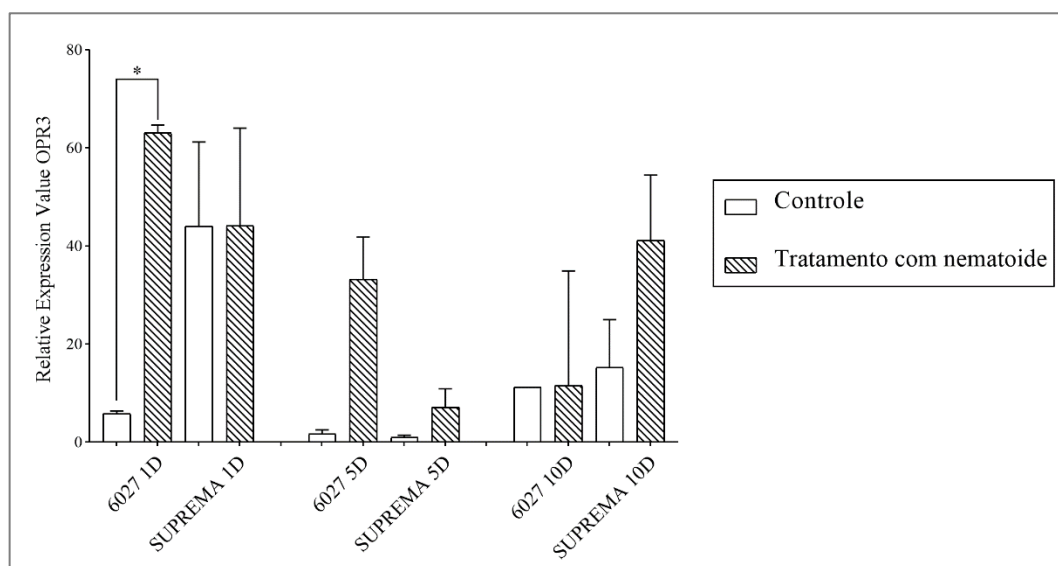


Figura 7: Gráfico de expressão gênica para o gene OPR3, onde SUPREMA são plantas convencionais e 6027 são plantas com alto teor de ácido oleico. Tempos de experimento: 1, 5 e 10 dias. As amostras não apresentaram significância estatística para teste de Tukey. Marcado com * os tratamentos que apresentaram significância estatística entre si após realização do teste T.

No gráfico da Figura 7, é possível verificar que todos os materiais inoculados com nematoide apresentaram valores relativos à expressão de OPR3 maiores quando comparados com os materiais que não tiveram contato com nematoide, com exceção da planta SUPREMA no primeiro dia de tratamento, onde tanto a planta inoculada quanto a não inoculada apresentaram valores iguais.

Comparando as plantas alto oleico (6027) com as convencionais (SUPREMA) é visto no tempo de 1 dia que a planta 6027 controle teve uma expressão cerca de 9 vezes menor do que a sua correspondente convencional. Os valores de expressão mais alto no primeiro dia pode indicar uma indução rápida da via pelo nematoide ou até mesmo uma sinalização por conta do

estresse sofrido pela planta durante o transplante das mudas da bandeja para os vasos. Entretanto, temos que considerar a diferença de expressão entre as plantas não inoculadas, indicando que a planta alto oleico tem uma menor expressão de OPR3 provavelmente devido a apresentar menor quantidade de ácido linolênico.

Ainda no tempo de 1 dia, nas amostras tratadas com nematoide, há uma maior indução na planta alto oleico em relação a planta normal, onde os valores de expressão são 1,4 vezes maiores. Esta maior indução poderia ser uma forma de compensar a baixa quantidade de transcritos de OPR3 pré-indução do estresse.

Em cinco dias de experimento, é possível notar uma redução bastante expressiva nas amostras não tratadas com nematoide, tanto nas amostras alto oleico quanto nas convencionais. Focando nas amostras inoculadas com nematoide, a planta alto oleico (6027) permaneceu com maior indução do que a planta normal (SUPREMA) do gene OPR3, embora teve uma redução de indução do gene quando comparado com o encontrado no intervalo de 1 dia.

Comportamento semelhante de expressão de OPR3 foi observado no estudo de Junior (2009), onde foi avaliada a expressão gênica de OPR3 em cacaueteiro sob efeito de *Moniliophthora perniciosa*, fungo responsável pela doença vassoura-de-bruxa. Neste estudo o gene OPR3 apresentou tendência de redução no nível do transcrito durante os períodos de coleta, e um nível de repressão maior no tempo médio, no caso, de 24h.

Em dez dias, as plantas não inoculadas com nematoide voltaram a aumentar o valor de expressão. Para a variedade SUPREMA, comparando os valores de expressão de 10 dias e 1 dia, há uma redução de 2,8 vezes. Entretanto, em 6027 no tempo 10 dias houve um aumento de 1,92 vezes na expressão. Vale ressaltar que para a amostra alto oleico controle (6027 10D) só é apresentado valor de uma repetição biológica, o que impossibilita a análise precisa dos resultados.

Analisando ainda o tempo de 10 dias, ao contrário nos tempos anteriores, nas amostras submetidas ao ataque de nematoide, aparentemente a variedade convencional (SUPREMA) teve uma maior resposta quando comparada com a variedade alto oleico (6027).

Analisando os valores de expressão entre as amostras não tratadas com nematoide vimos que não há significância estatística entre elas (Teste de Tukey, $p > 0,05$), ou seja, as amostras de alto teor de ácido oleico e amostras convencionais não apresentam diferença estatística entre si. Embora há uma expressão 7,5 vezes maior em SUPREMA quando comparado com 6027 no tempo de 1 dia.

Ao analisar as plantas inoculadas com nematoide, também não há diferença estatística entre as amostras alto oleico e convencionais (Teste de Tukey, $p > 0,05$). Embora não tenha

dado diferença estatística, quando comparamos os valores absolutos de expressão de OPR3, no tempo de 5 dias, a planta alto oleico expressou 4,5 vezes mais do que a planta convencional. Já no tempo de 10 dias, foi observado comportamento inverso, onde a planta SUPREMA expressou 4 vezes mais do que a planta 6027.

Foi realizado teste T afim de comparar estatisticamente os níveis de expressão entre as amostras tratadas com nematoide e não tratadas. No gráfico da Figura 7, somente as amostras alto oleico (6027) no tempo de 1 dia apresentaram relevância estatística, onde a amostra em contato com nematoide obteve valores 10,8 vezes maior. Apesar de apresentarem valor $p > 0,05$ no tempo de 5 dias, é notável que há um valor de expressão de OPR3 maior nas amostras em contato com nematoide tanto nas plantas alto oleico quanto nas plantas normais, sendo cerca de 10 vezes maior na 6027 e 7 vezes na planta SUPREMA.

No tempo de 10 dias apesar de também não apresentar significância estatística ($p > 0,05$), a planta convencional expressou 2,7 vezes mais na amostra tratada com nematoide quando comparada com a planta não tratada. A planta alto oleico controle não pôde ser analisada estatisticamente, pois não há repetição biológica deste material, portanto não é possível calcular os desvios padrão dessas amostras.

Analisando a cinética de expressão de OPR3 observamos que a planta alto oleico tem uma ativação de expressão gênica (valores inoculados menos valores controle) em 1 dia decaindo ao longo de 5 e 10 dias. Já a planta convencional possui uma ativação mais tardia, começando em 5 dias e continuando praticamente estável até 10 dias. Para a biossíntese de ácido jasmônico é necessário o ácido linolênico como precursor. Na planta 6027 há uma maior disponibilidade de ácido oleico em sua composição, conseqüentemente, há uma menor disposição de ácido linolênico. A baixa disponibilidade de ácido linolênico na planta alto oleico 6027 pode ter alterado a quantidade de ácido jasmônico que naturalmente é produzido em homeostase, de forma que a planta precisa aumentar a expressão de genes da via para acelerar a sinalização quando em condição de estresse. Nossos dados não nos permitem expandir sobre esta hipótese, mas uma dosagem de ácido jasmônico poderia sanar este questionamento. Da mesma forma, seria importante verificar se a planta alto oleico possui um grau de susceptibilidade ainda maior quando comparada com a planta normal. Pode ser que apesar de toda a modificação observada, haja um efeito compensatório evitando que a planta seja mais susceptível. Portanto, um experimento verificando o grau de susceptibilidade destes dois materiais estão em nossos planos.

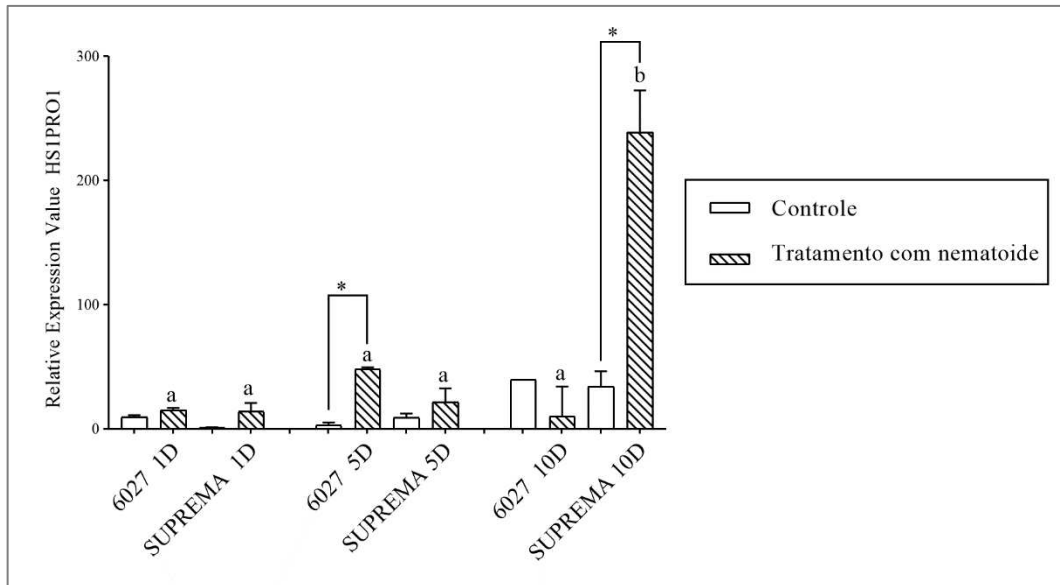


Figura 8: Gráfico de expressão gênica para o gene HS1PRO1. Onde SUPREMA são plantas convencionais e 6027 são plantas com alto teor de ácido oleico. Tempos de experimento: 1, 5 e 10 dias. As amostras que apresentaram significância estatística no teste de Tukey são legendadas com a e b, e médias significativas não compartilham mesma letra. Marcado com * os tratamentos que apresentaram significância estatística entre si após realização do teste T.

O gene HS1PRO1 é um gene de resistência específico ao nematoide de cisto *Heterodora schachtii* encontrado em beterraba e acredita-se que ele pertence a uma classe de genes de resistência, chamados genes R. Dados preliminares encontrados por McLean e colaboradores (2007) sugeriram que a expressão de HS1PRO1 aumenta a resistência de da soja contra nematoide de cisto da soja (NCS), sendo este gene um candidato promissor para a engenharia genética de resistência a nematoides. Dados de expressão de HS1PRO1 são mostrados na Figura 8.

Ao analisar o gráfico, é possível verificar que as amostras tratadas com nematoide apresentaram valores de expressão maiores quando comparadas com as amostras controle durante todo o intervalo do experimento, com exceção da amostra alto oleico no tempo de 10 dias, onde foi feita a análise de somente uma repetição biológica, impossibilitando a análise precisa dos dados. Este comportamento observado indica que houve ação do nematoide e estresse causado às plantas, requisito necessário para ativação da biossíntese de ácido jasmônico.

No tempo de experimento de 1 dia é possível verificar que tanto a amostra alto oleico (6027), quanto a convencional (SUPREMA) tiveram valores de expressão semelhantes nas amostras inoculadas. Apesar disto, a ativação transcricional em SUPREMA é maior do que em 6027.

No tempo de cinco dias, a planta 6027 inoculada com nematoide expressou mais o gene HS1PRO1 do que a planta SUPREMA inoculada, mostrando que neste intervalo, a planta alto oleico tem o nível de transcritos levemente maior e uma ativação transcricional maior. Porém, ao analisar o tempo de dez dias, têm-se uma resposta inversa, onde a amostra SUPREMA tratada com nematoide apresentou valores de expressão 23 vezes maior quando comparada com a amostra alto oleico (6027) na mesma condição. Com isso é possível observar que a cinética de expressão na planta 6027 tem pico de ativação em 5 dias, enquanto a planta SUPREMA tem uma ativação máxima em 10 dias.

Foi realizado teste estatístico entre as plantas controle e o p valor encontrado foi superior ao valor de 0,05 (teste de Tukey), indicando que não há significância estatística entre as plantas alto oleico e convencionais para o gene HS1PRO1 durante todo o intervalo experimental. Este valor indica que tanto as plantas 6027 quanto às SUPREMA respondem de maneira semelhante quanto a expressão de HS1PRO1 quando não há o contato com o nematoide de cisto da soja (NCS).

Resultado diferente foi encontrado ao analisar as plantas que sofreram com o ataque dos nematoides, onde no tempo de 10 dias, a planta SUPREMA apresentou significância estatística dentre as demais. Observando o gráfico da Figura 8 é possível inferir que quanto maior o tempo de exposição da planta ao ataque dos nematoides, maior é a expressão desse gene.

Ao verificar o resultado do teste T, foi encontrada significância estatística ($p < 0,05$) entre as amostras 6027 controle e tratadas com nematoide no tempo de 5 dias e na planta SUPREMA controle e tratada com nematoide no tempo de 10 dias apenas. No tempo de 5 dias, a planta 6027 inoculada com nematoide teve uma expressão cerca de 15 vezes maior do que a planta controle, ao passo que para 10 dias, SUPREMA obteve um valor 7 vezes maior comparando a planta inoculada com a controle. Este resultado nos informa que as plantas alto oleico tem uma ativação da transcrição estatisticamente significativa em 5 dias, enquanto as plantas convencionais apresentam ativação da transcrição significativa em 10 dias. Entretanto, a quantidade de transcritos encontrados em SUPREMA em 10 dias na amostra inoculada é bem maior quando comparado aos demais tempos.

Com os resultados encontrados, não é possível excluir a hipótese de que o aumento de ácido oleico na planta e consequente redução de ácido linolênico pode afetar a via de sinalização de ácido jasmônico. São necessários outros experimentos chave, como dosagem de jasmonato e avaliação de resistência a nematoide, entretanto, conseguimos evidenciar que a transcrição de

genes importantes dessas vias é diferente nos dois materiais indicando que pelo menos a nível de transcrição existe diferença entre plantas alto oleico e convencionais.

5 CONCLUSÕES

- Os marcadores FAD2-1A e FAD2-1B foram eficientes na determinação dos alelos para alto oleico. Através do uso desses marcadores foi possível selecionar um indivíduo com potencial para o programa de retrocruzamentos e avançar algumas gerações.
- Foi confirmada a ausência de gene transgênico nas variedades desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja (PQMS). O melhoramento genético por métodos convencionais é uma premissa importante para o lançamento de novas cultivares com características esperadas por parte do mercado internacional.
- Parte dos retrocruzamentos previstos foi executado e os alelos para alto oleico está sendo introgridindo na linhagem UFVS77C10. Está planejado o avanço dos retrocruzamentos e será dada continuidade pelo PQMS.
- A transcrição do gene OPR3 e HS1PRO1 apresentam diferenças, porém, os resultados indicam, que a nível de transcrição, existe diferenças entre as plantas com alto teor de oleico e as plantas convencionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS. **Estatística Mensal do Complexo Soja**. Maio, 2022a. Disponível em: < <https://abiove.org.br/estatisticas/>>. Acesso em 15/06/2022.

ACOSTA, I. F. et al. tasselseed1 Is a Lipoxygenase Affecting Jasmonic Acid Signaling in Sex Determination of Maize. **Science**, v. 323, n. 5911, p. 262–265, 9 jan. 2009.

BACHLAVA, E. et al. Mapping and Comparison of Quantitative Trait Loci for Oleic Acid Seed Content in Two Segregating Soybean Populations. **Crop Science**, v. 49, n. 2, p. 433–442, mar. 2009.

BARROS, E., G., SOUZA T., L., P., O. Biotecnologia aplicada à cultura do feijoeiro. In: CANÇADO, G. M. A., LONDE, L. N. (Eds.) **Biotecnologia aplicada à agropecuária**. Belo Horizonte: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, 648 p. 2012.

BILYEU, K. D. et al. Three Microsomal Omega-3 Fatty-acid Desaturase Genes Contribute to Soybean Linolenic Acid Levels. **Crop Science**, v. 43, n. 5, p. 1833–1838, set. 2003.

CARRÃO-PANIZZI, M. C. et al. Environmental and genetic variation of isoflavone content of soybean seeds grown in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1444–1451, nov. 2009.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Produção nacional de grãos é estimada em 269,3 milhões de toneladas na safra 2021/22**, Brasília, Abril/22.

CROPLIFE, Brasil. **Desmistificando a Soja Transgênica**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/conceitos/desmistificando-a-soja-transgenica/>. Acesso em: 22 jun. 2022.

DARR, L. et al. Field Performance of High Oleic Soybeans with Mutant *FAD2-1A* and *FAD2-1B* Genes in Tennessee. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 97, n. 1, p. 49–56, 22 jan. 2020.

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

EMBRAPA. **Cultivares Transgênicas de Soja RR são indicadas para o Cerrado**. [S. l.], 24 jun. 2005. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/17985240/cultivares-transgenicas-de-soja-rr-sao-indicadas-para-o-cerrado>. Acesso em: 24 jun. 2022.

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

FERREIRA, M. E. GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220.

GOETTEL, W. et al. Identification and characterization of transcript polymorphisms in soybean lines varying in oil composition and content. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 299, 23 dez. 2014.

HOWE, G. A. et al. Cytochrome P450-Dependent Metabolism of Oxylipins in Tomato. Cloning and Expression of Allene Oxide Synthase and Fatty Acid Hydroperoxide Lyase. **Plant Physiology**, v. 123, n. 2, p. 711–724, 1 jun. 2000.

HU, R. et al. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 10, n. 1, p. 93, 28 dez. 2009.

KING, Z. et al. Non-toxic and efficient DNA extractions for soybean leaf and seed chips for high-throughput and large-scale genotyping. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 9, p. 1875–1879, 27 set. 2014.

LI, Q. et al. Validation of reference genes for real-time quantitative PCR normalization in soybean developmental and germinating seeds. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 10, p. 1789–1798, 16 out. 2012.

MARQUES, Ana Catarina Guerreiro. **A Sinalização por Ácido Jasmônico e a resistência a fungos biotróficos em videira**. 2015. 51 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Genética) - Universidade de Lisboa, [S. l.], 2015.

MATSUI, H. et al. Structure and expression of 12-oxophytodienoate reductase (subgroup I) genes in pea, and characterization of the oxidoreductase activities of their recombinant products. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 271, n. 1, p. 1–10, 15 fev. 2004.

MORALES, Aguida & Lemos, Eliana & Pagliarini, Renata & Marin, Silvana & Marcelino-Guimaraes, Francismar & Silva, Joao Flavio & Silva, V & Alves Pereira, Alan & Nepomuceno, Alexandre. (2009). **Expressão de Genes Envolvidos na Resistência da Soja a Meloidogyne javanica**. Nematologia Brasileira. 226.

MOZAFFARIAN, D. et al. Trans Fatty Acids and Cardiovascular Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 15, p. 1601–1613, 13 abr. 2006.

PATIL, G. et al. Development of SNP Genotyping Assays for Seed Composition Traits in Soybean. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2017, p. 1–12, 25 maio 2017.

PHAM, A.-T. et al. Mutant alleles of FAD2-1A and FAD2-1B combine to produce soybeans with the high oleic acid seed oil trait. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 195, 9 dez. 2010.

PHAM, A.-T.; SHANNON, J. G.; BILYEU, K. D. Combinations of mutant FAD2 and FAD3 genes to produce high oleic acid and low linolenic acid soybean oil. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 125, n. 3, p. 503–515, 4 ago. 2012.

ROSS, A. J. et al. Agronomic and Seed Traits of 1%-Linolenate Soybean Genotypes. **Crop Science**, v. 40, n. 2, p. 383–386, mar. 2000.

SANTOS, Ana Luiza Marques dos. **Organismos Geneticamente Modificados na Agricultura: Histórico, Impactos, Incertezas e Legislação Ambiental**. 2016. 434 f. Tese (Doutorado em Geografia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro/SP, 2016.

SECATTO, Marcelo. **Desenvolvimento da síntese total do ácido jasmônico visando aplicação em escala industrial**. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado Profissional) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

SELIG, P. et al. Jasmonate-dependent plant defenses mediate soybean thrips and soybean aphid performance on soybean. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 10, n. 4, p. 273–282, 27 ago. 2016.

SILVA, Luiz Cláudio Costa. **Caracterização Molecular de Alelos Associados à Qualidade do Grão de Soja**. 2017. 117 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

SILVA, L. C. C. et al. Reference Genes and Expression Analysis of Seed Desaturases Genes in Soybean Mutant Accessions. **Biochemical Genetics**, v. 60, n. 3, p. 937–952, 23 jun. 2022.

SOUZA, T. L. P. O. de. **Uso de marcadores moleculares no melhoramento de plantas para resistência a nematoides**. In: Congresso Brasileiro De Nematologia. Nematoides: da Ciência ao Campo. Caldas Novas, 2019.

U.S. SOYBEAN EXPORT COUNCIL (org.). **U.S. High Oleic Soybeans & High Oleic Soybean Oil Sourcing Guide for International Customers**. Second Edition. ed. [S. l.: s. n.], September 2021. 40 p.

WARNER, K.; FEHR, W. Mid-Oleic/Ultra Low Linolenic Acid Soybean Oil: A Healthful New Alternative to Hydrogenated Oil for Frying. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 10, p. 945–951, 5 out. 2008.

WEBER, H. Fatty acid-derived signals in plants. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 5, p. 217–224, maio 2002.

ZALOGA, G. P. et al. Trans Fatty Acids and Coronary Heart Disease. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 21, n. 5, p. 505–512, 16 out. 2006.

ZHANG, Z. et al. In situ hydrogenation and decarboxylation of oleic acid into heptadecane over a Cu–Ni alloy catalyst using methanol as a hydrogen carrier. **Green Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 197–205, 2018.