

MARLEY MARICO UTUMI

**MELHORAMENTO GENÉTICO DA PROTEÍNA DA SOJA:  
ELIMINAÇÃO DE LIPOXIGENASES E DAS SUBUNIDADES  
 $\alpha'$  E G4, USO DE RAPD-PCR NA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS E  
NA IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES LIGADOS AO GENE Cgy1**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fitotecnia, para obtenção do título de "*Doctor Scientiae*".

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
DEZEMBRO - 1996

MARLEY MARICO UTUMI

**MELHORAMENTO GENÉTICO DA PROTEÍNA DA SOJA:  
ELIMINAÇÃO DE LIPOXIGENASES E DAS SUBUNIDADES  
 $\alpha'$  E G4, USO DE RAPD-PCR NA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS E  
NA IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES LIGADOS AO GENE Cgy1**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fitotecnia, para obtenção do título de "*Doctor Scientiae*".

APROVADA: 18 de novembro de 1996.

---

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros  
(Conselheiro)

---

Prof. Carlos Siguheyuki Sedyama  
(Conselheiro)

---

Prof. Paulo Roberto Mosquim

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Goreti de Almeida Oliveira

---

Prof. Maurílio Alves Moreira  
(Orientador)

## APÊNDICE

Aos meus filhos, Paulo Tadashi e Carolina Mieko.

Ao meu esposo, Vicente.

Aos meus pais, Shigueiti e Mieko.

Aos meus sogros, Marcos e Elia.

## **AGRADECIMENTO**

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Curso e ao Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pelas facilidades oferecidas para realização dos experimentos.

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

Ao Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CPAF-RO/EMBRAPA), pela oportunidade concedida para término do curso.

Ao Professor Maurílio Alves Moreira, pelo apoio, pela dedicação e orientação segura.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros, pelos ensinamentos, pelo apoio e pela dedicação.

Ao Professor Carlos Sigueyuki Sedyama, pelas sugestões e pelo apoio.

Aos professores Maria Goreti Almeida de Oliveira e Paulo Roberto Mosquim, pelas sugestões e pelo apoio.

Aos professores Tuneo Sedyama e Tocio Sedyama, pelo apoio e incentivo.

Ao Dr. Keisuke Kitamura, pesquisador do National Agricultural Research Center, Tsukuba, Japão, pela concessão de sementes da variedade Keburi.

Ao Professor Lewis Joel Greene, do Centro Interdepartamental de Química de Proteínas, da Universidade Estadual de Medicina de Ribeirão Preto, USP, pela análise de aminoácidos.

Ao Paulo Manoel Pinto Alves e Victor Ferreira de Souza, do CPAF-RO, pela amizade, pelo apoio e incentivo.

Às famílias Utumi, Towata e Campos Godinho, pelo apoio e incentivo contínuos.

Ao Marcos Newman, pela amizade e pelo apoio.

Aos casais Telma e João Batista e Dalila e Elpídio, pela amizade, pelo apoio e incentivo.

Aos amigos e colegas da Universidade Federal de Viçosa e CPAF-RO, pelo apoio, incentivo e convívio.

Ao colega, companheiro e esposo, Vicente.

Ao Paulo Tadashi e à Carolina Mieko, pela paciência e compreensão nos inúmeros momentos cedidos para a conclusão do curso.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e conclusão do curso.

## **BIOGRAFIA**

Marley Marico Utumi, filha de Shigueiti Utumi e Mieko Towata, nasceu em 1º de dezembro de 1965, em Nova Esperança, Estado do Paraná, Brasil.

Em 1988, graduou-se em Engenharia Agrônoma, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

Nesta mesma Instituição, concluiu o Curso de Mestrado em Fitotecnia, em 1992, e no mesmo ano ingressou no Curso de Doutorado em Fitotecnia, vindo a defender tese em novembro de 1996.

Em 1994, foi contratada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), lotada no Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia (CPAF-RO), como pesquisadora na área de Olericultura.

## CONTEÚDO

	Página
EXTRATO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	6
ARTIGO 1	
EFEITO DA ELIMINAÇÃO GENÉTICA DE LIPOXIGENASES E DE POLIPEPTÍDEOS DE RESERVA NA QUALIDADE DA SOJA PARA A AGROINDÚSTRIA .....	10
ABSTRACT .....	10
RESUMO .....	11
INTRODUÇÃO .....	12
MATERIAL E MÉTODOS .....	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	19
CONCLUSÕES .....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32
ARTIGO 2	

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RAPD-PCR NA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE SOJA PARA ALIMENTAÇÃO HUMANA EM POPULAÇÕES SEGREGANTES .....	37
ABSTRACT .....	37
RESUMO .....	37
INTRODUÇÃO .....	38
MATERIAL E MÉTODOS .....	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58
ARTIGO 3	
MARCADOR RAPD LIGADO AO GENE Cgy1 DA PROTEÍNA DE RESERVA $\beta$ -CONGLICININA .....	61
ABSTRACT .....	61
RESUMO .....	61
INTRODUÇÃO .....	62
MATERIAL E MÉTODOS .....	64
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68
3. RESUMO E CONCLUSÕES .....	71
APÊNDICE .....	74

## EXTRATO

UTUMI, Marley Marico. D.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 1996. **Melhoramento genético da proteína da soja: eliminação de lipoxigenases e das subunidades  $\alpha'$  e G4, uso de RAPD-PCR na seleção de genótipos e na identificação de marcadores ligados ao gene Cgy1.** Professor Orientador: Maurílio Alves Moreira. Professores Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros e Carlos Siqueyuki Sedyama.

Este trabalho foi realizado com genótipos de soja com ausência de lipoxigenases (LOX) e das subunidades  $\alpha'$  e G4, componentes das proteínas de reserva da soja, para verificar o efeito dessas ausências nas características físico-químicas das sementes. Também foi utilizada a técnica de RAPD-PCR para selecionar indivíduos geneticamente mais próximos do progenitor recorrente e na identificação de marcador RAPD ligado ao gene que codifica a subunidade  $\alpha'$ . Os genótipos utilizados foram obtidos por meio de cruzamentos de progenitores contrastantes para os caracteres selecionados, seguidos de seleção por técnicas bioquímicas não destrutivas. Observou-se drástica redução na evolução de hexanal em genótipos sem lipoxigenases, indicando melhoria de sabor para alimentação humana. Não foi observada diminuição nos teores de proteína total da semente com a eliminação de lipoxigenases

ou das subunidades  $\alpha'$  e G4. A eliminação da subunidade G4 promoveu aumento do teor de metionina, enquanto com a eliminação de  $\alpha'$  ocorreu diminuição no teor desse aminoácido. Foram utilizadas características fenotípicas e a técnica de RAPD-PCR para estimar as distâncias genéticas entre indivíduos das populações F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> (selecionados para ausência de LOX e das subunidades protéicas  $\alpha'$  e G4) em relação à linhagem PB<sub>2,3</sub> (linhagem sem LOX<sub>2</sub> e 3) a ser usada como progenitor recorrente. Essas populações foram derivadas dos seguintes cruzamentos: 'PBTN' (sem LOX<sub>1, 2</sub> e 3) x ['Keburi' (sem  $\alpha'$ )] x 'UFV91.751' (sem LOX<sub>2</sub> e 3)]. Tanto os caracteres fenotípicos quanto os marcadores RAPD permitiram a discriminação de indivíduos geneticamente mais próximos da linhagem PB<sub>2,3</sub>, sendo sua utilização conjunta mais eficiente. Por meio da técnica de "Bulked Segregant Analysis" foi possível identificar um marcador RAPD ligado em fase de repulsão ao gene que codifica a subunidade  $\alpha'$ .

## ABSTRACT

UTUMI, Marley Marico. D.S., Universidade Federal de Viçosa, December 1996. **Soybean protein quality improvement: genetic elimination of lipoxygenases and the  $\alpha'$  and G4 subunits, use of RAPD-PCR to select genotypes and to identify marker linked to the Cgy1 gene.** Adviser: Maurílio Alves Moreira. Committee Members: Everaldo Gonçalves de Barros and Carlos Siqueyuki Sedyama.

This work was carried out on soybean genotypes lacking lipoxygenases and the storage protein  $\alpha'$  and G4 subunits to verify the effect of this absence on the physical-chemical characteristics of seeds. The RAPD-PCR technique was also used to select individuals genetically more similar to the recurrent parent and to identify the RAPD marker linked to the gene which codifies the  $\alpha'$  subunit. The genotypes were obtained from crosses among contrasting progenitors for the selected characters, followed by nondestructive biochemical analysis. A drastic reduction in the evolution of hexanal in genotypes without lipoxygenases was observed, indicating food flavor enhancement. No decrease in total seed protein content was observed with the elimination of lipoxygenases or  $\alpha'$  and G4 subunits. The elimination of the G4 subunit promoted an increase in the methionine content whereas elimination of the  $\alpha'$  subunit caused a decrease in the amount of this amino acid. Phenotypic

characteristics and the RAPD-PCR technique were used to estimate the genetic distances among individuals of the  $F_2$  and  $F_3$  populations (selected for the absence of LOX and of the  $\alpha'$  and G4 protein subunits) in relation to PB 2,3 (a line without LOX 2 and 3) which will be used as recurrent parent. These populations were derived from the following crosses 'PBTN' (without LOX 1, 2, and 3) x ['Keburi' (without  $\alpha'$ )] x 'UFV 91.751' (without LOX 2 and 3)]. Both the phenotypic characters and the RAPD markers allowed for discriminating individuals genetically more similar to the line PB 2,3, with their combined use being more efficient. The use of the Bulk Segregant Analysis technique made possible the identification of a RAPD marker linked in repulsion to the  $\alpha'$  gene.

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar da grande contribuição da soja na produção nacional de grãos, seu uso na dieta alimentar do brasileiro é bastante modesto. A produção nacional destina-se, em sua maior parte, à obtenção do óleo e do farelo de soja.

O óleo e seus derivados (gordura hidrogenada e margarina) são amplamente aceitos pelo consumidor brasileiro. No entanto, a fração protéica, que representa em torno de 40% do grão, e seus derivados têm pouca aceitação no Brasil.

Essa barreira alimentar aos produtos da soja está associada à baixa qualidade do grão que é utilizado no processamento industrial. Os aspectos inerentes a esta incluem o "beany-flavor" e a qualidade protéica. O "beany-flavor" refere-se ao sabor característico de produtos derivados da soja, enquanto a baixa qualidade protéica deve-se ao baixo nível de aminoácidos sulfurados, bem como às propriedades funcionais da proteína.

O "beany-flavor" dos grãos de soja resulta principalmente da atividade da enzima lipoxigenase (EC 1.13.11.12). Essa enzima catalisa a hidroperoxidação de ácidos graxos poliinsaturados que apresentam na sua estrutura o grupo 1,4-cis, cis-pentadieno, produzindo hidroperóxidos que, decompostos em reações subseqüentes, geram compostos

carbonílicos de cadeia curta que constituem o "beany flavor" (WOLF, 1975).

Nas sementes da maioria dos cultivares comerciais de soja encontram-se três formas isoenzimáticas: lipoxigenase 1 (LOX<sub>1</sub>), lipoxigenase 2 (LOX<sub>2</sub>) e lipoxigenase 3 (LOX<sub>3</sub>) (AXELROD et al., 1981). Entretanto, foram identificados no germoplasma de soja genótipos com ausência de LOX<sub>1</sub> (PI408251) (HILDEBRAND e HYMOWITZ, 1981); de LOX<sub>2</sub> (PI86023) (KITAMURA, 1984) e de LOX<sub>3</sub> (Wasenatsu e Ichigowase) (KITAMURA et al., 1983). Uma vez que os genes que codificam LOX<sub>1</sub> e 2 estão ligados, numa primeira etapa foi possível obter por retrocruzamentos linhagens com ausência de LOX<sub>1</sub> e 3 e de LOX<sub>2</sub> e 3 (KITAMURA et al., 1985; MOREIRA et al., 1993). Mais recentemente, HAJIKA et al. (1991) conseguiram obter linhagens mutantes com ausência de LOX<sub>1</sub> e 2 e de LOX<sub>1</sub>, 2 e 3 por tratamentos de sementes F<sub>2</sub>, de cruzamentos entre linhagens sem LOX<sub>1</sub> e 3 com linhagens sem LOX<sub>2</sub> e 3, com radiações gama, possibilitando, dessa forma, a completa eliminação genética das lipoxigenases de grãos de soja.

A eliminação genética de lipoxigenases de sementes de soja é considerada a forma mais eficiente de reduzir o "beany flavor", porque o tratamento térmico utilizado para inativação dessas isoenzimas, apesar de ter eficiência razoável, prejudica sensivelmente as propriedades funcionais das proteínas (KINSELLA, 1979) e a extração dos compostos responsáveis pelo "beany flavor" com solventes orgânicos são dispendiosos e não satisfatórios (KITAMURA et al., 1983).

A qualidade protéica da soja é grandemente afetada pelas proteínas de reserva, glicinina e  $\beta$ -conglucina, que representam cerca de 70% da proteína total das sementes de soja (HILL e BREIDENBACH, 1974).

A glicinina é uma proteína oligomérica com massa molecular de aproximadamente 350 KDa, constituída por seis polipeptídeos de ponto isoelétrico ácido: A1a, A1b, A2, A3, A4 e A5; e cinco de ponto isoelétrico básico: B1a, B1b, B2, B3 e B4 (MOREIRA et al., 1979, 1981).

Esses polipeptídeos estão associados aos pares por uma ligação bissulfídrica específica entre um polipeptídeo de caráter ácido e outro de caráter básico, formando as subunidades A1aB2, A1bB1b, A2B1a, A3B4 e A5A4B3 (MOREIRA et al., 1979, 1981; STASWICK et al., 1981). Atualmente, as subunidades são denominadas G1 (A1aB2), G2 (A2B1a), G3 (A1bB1b), G4 (A5A4B3) e G5 (A3B4), sendo codificadas pelos genes Gy1, Gy2, Gy3, Gy4 e Gy5, respectivamente (CHO et al., 1989).

As subunidades G1, G2 e G3 são mais uniformes quanto ao tamanho e possuem de seis a oito resíduos de metionina, enquanto as subunidades G4 e G5 contêm no máximo três (MOREIRA et al., 1979, 1981; STASWICK et al., 1981; NIELSEN, 1984).

A outra principal proteína de reserva de sementes de soja é a  $\beta$ -conglícinina, uma glicoproteína com massa molecular estimada em 150-170 KDa. Esta proteína é composta por três subunidades:  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ , codificadas pelos genes Cgy1, Cgy2 e Cgy3, respectivamente (THANH e SHIBASAKI, 1977).

Apesar de as três subunidades da  $\beta$ -conglícinina terem em comum abundância em resíduos de aspartato, glutamato, leucina e arginina (COATES et al., 1985), elas são mais heterogêneas que as subunidades da glicinina. Verificou-se pouca homologia entre  $\alpha$  e  $\alpha'$  (COATES et al., 1985), enquanto a subunidade  $\beta$  apresentou alto teor de aminoácidos hidrofóbicos em comparação com  $\alpha$  e  $\alpha'$  (HIRANO et al., 1987).

No que diz respeito à qualidade nutricional da  $\beta$ -conglícinina, as subunidades  $\alpha$  e  $\alpha'$  possuem dois e três resíduos de metionina, respectivamente, e a subunidade  $\beta$  não possui este aminoácido (COATES et al., 1985).

A glicinina possui maior número de resíduos de aminoácidos sulfurados, além de propriedades funcionais, como capacidade de geleificação e firmeza do gel, superiores às da  $\beta$ -conglícinina (NAKAMURA et al., 1986; KOHYAMA et al., 1992, 1995). Também tem-se verificado que a  $\beta$ -conglícinina apresenta maior capacidade de adsorção de compostos responsáveis pelo "beany flavor" (O'NEILL e KINSELLA, 1987) e, além disso, as subunidades  $\alpha$  e  $\alpha'$  ligam-se

especificamente à proteína *Gly m Bd 30K*, identificada como o principal fator alergênico de soja, em extratos hidrossolúveis desta leguminosa (SAMOTO et al., 1996).

A existência de genótipos com ausência de lipoxigenases e subunidades protéicas  $\alpha'$  (KITAMURA et al., 1984) e G4 (FONTES e MOREIRA, 1984) possibilita a obtenção de genótipos de soja com ausência simultânea desses constituintes das sementes e, possivelmente, com melhor sabor e qualidade protéica.

A utilização de marcadores moleculares do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) poderá acelerar o processo de obtenção de tais genótipos.

A técnica de RAPD, descrita simultaneamente por WILLIAMS et al. (1990) e WELSH e MCCLELLAND (1990), utiliza a reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) descrita por SAIKI et al. (1985), para amplificar seqüências de DNA com iniciador ou “primer” de seqüência aleatória. As vantagens dessa técnica são: automação, utilizar pequenas quantidades de DNA e detectar diferenças entre genótipos bem próximos (WILLIAMS et al., 1990; HU e QUIROS, 1991; SCKROCH et al., 1992) o que possibilita acelerar programas de melhoramento.

A capacidade de distinção de indivíduos geneticamente próximos é especialmente importante em soja, em razão da estreita base genética desta cultura. DELANNAY et al. (1983) verificaram que mais de 80% do “pool” gênico dos cultivares plantados nos Estados Unidos da América e Canadá provém de, no máximo, dez ancestrais. As variedades brasileiras também são derivadas de poucos ancestrais e dentre eles vários são variedades norte-americanas (HIROMOTO e VELLO, 1986; ABDELNOOR et al., 1995).

Também é possível identificar marcadores ligados a uma característica específica, utilizando linhagens quase isogênicas (YOUNG et al., 1988) ou a técnica de BSA (Bulked Segregant Analysis) (MICHELMORE et al., 1991). A técnica de BSA permite detectar diferenças entre duas amostras agrupadas (“bulks”) de DNA de uma população segregante, proveniente de cruzamento entre indivíduos

contrastantes para a característica de interesse, simplificando e agilizando o processo de identificação de marcadores ligados a uma determinada característica.

Este trabalho teve como objetivos específicos:

- eliminar geneticamente lipoxigenases e subunidades protéicas  $\alpha'$  e G4 de sementes de soja;
- verificar o efeito da eliminação genética de lipoxigenases e das subunidades  $\alpha'$  e G4, componentes das proteínas de reserva, na qualidade da proteína de soja para uso na agroindústria;
- verificar a eficiência da técnica de RAPD-PCR na seleção de genótipos de soja contendo genes que determinam a ausência de lipoxigenases e das subunidades protéicas  $\alpha'$  e G4 em programas de melhoramento (seleção de indivíduos geneticamente mais próximos ao progenitor recorrente em gerações precoces); e
- identificar marcador molecular RAPD ligado ao gene Cgy1, que codifica a subunidade protéica  $\alpha'$ .

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOOR, R.V., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA technique and comparative analysis with pedigree data. **Rev. Bras. Genet.**, v.18, n.2, p.265-273, 1995.
- AXELROD, B., CHEESEBOURGH, T.M., LAAKSO, S. Lipoxygenase from soybeans. **Meth. Enzymol.**, v.71, p.441-451, 1981.
- CHO, T.J., DAVIES, C.S., NIELSEN, N.C. Inheritance and organization of glycinin genes in soybean. **Plant Cell**, v.1, n.3, p.329-337, 1989.
- COATES, J.B., MEDEIROS, J.S., THANH, V.H. et al. Characterization of the subunits of  $\beta$ -conglycinin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.243, n.1, p.184-194, 1985.
- DELANNAY, X., RODGERS, D.M., PALMER, R.G. Relative genetic contributions among ancestral lines to North American soybean cultivars. **Crop Sci.**, v.23, p.944-949, 1983.
- FONTES, E.P.B., MOREIRA, M.A. Variações genéticas na composição polipeptídica da proteína da soja. **Arq. Biol. Tecnol.**, v.27, n.3, p.319-328, 1984.
- HAJIKA, M., IGITA, K., KITAMURA, K. A line lacking all the seed lipoxygenase isozymes in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) induced by gamma-ray irradiation. **Japan. J. Breed.**, v.41, n.3, p.507-509, 1991.

- HILDEBRAND, D.F., HYMOWITZ, T. Two soybean genotypes lacking lipoxygenase-1. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.49, p.33-35, 1981.
- HILL, J.E., BREIDENBACH, R.W. Proteins of soybean seeds. **Plant Physiol.**, v.53, n.5, p.742-746, 1974.
- HIRANO, H., KAGAWA, H., KAMATA, Y. et al. Structural homology among the major 7S globulin subunits of soybean seed storage proteins. **Phytochemistry**, v.26, p.41-45, 1987.
- HIROMOTO, D.M., VELLO, N.A. The genetic base of Brazilian soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars. **Rev. Bras. Genet.**, v.9, p.295-306, 1986.
- HU, J., QUIROS, C.F. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. **Plant Cell Rep.**, v.10, p.505-511, 1991.
- KINSELLA, J.E. Functional properties of soy proteins. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.56, p.242-258, 1979.
- KITAMURA, K. Biochemical characterization of lipoxygenase lacking mutants, L-1-less, L-2-less, and L-3-less soybeans. **Agric. Biol. Chem.**, v.48, n.9, p.2339-2346, 1984.
- KITAMURA, K., DAVIES, C.S., KAIZUMA, N. et al. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. **Crop Sci.**, v.23, n.5, p.924-927, 1983.
- KITAMURA, K., DAVIES, C.S., NIELSEN, N.C. Inheritance of alleles for Cgy1 and Gy4 storage protein genes in soybean. **Theor. Appl. Genet.**, v.68, p.253-257, 1984.
- KITAMURA, K., KUMAGAI, A., KIKUCHI, A. Inheritance of lipoxygenase-2 and genetic relationship among genes for lipoxygenase-1, -2 and -3 isozymes in soybean seeds. **Japan. J. Breed.**, v.35, n.4, p.413-420, 1985.
- KOHYAMA, K., YOSHIDA, M., NISHINARI, K. Rheological study on gelation of soybean 11S protein by glucono- $\delta$ -lactone. **J. Agric. Food Chem.**, v.40, p.740-744, 1992.
- KOHYAMA, K., MURATA, M., TANI, F. et al. Effects of protein composition on gelation of mixtures containing soybean 7S and 11S globulins. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.59, p.240-245, 1995.

- MICHELMORE, R.W., PARAN, I., KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.9828-9832, 1991.
- MOREIRA, M.A., HERMODSON, M.A., LARKINS, B.A. et al. Partial characterization of the acidic and basic poly peptides of glycinin. **J. Biol. Chem.**, v.254, n.19, p.9921-9926, 1979.
- MOREIRA, M.A., HERMODSON, M.A., LARKINS, B.A. et al. Comparison of the primary structure of the acidic polypeptides of glycinin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.210, p.663-642, 1981.
- MOREIRA, M.A., TAVARES, S.R., RAMOS, V. et al. Hexanal production and TBA number are reduced in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seeds lacking lipoxygenase isozymes 2 and 3. **J. Agric. Food Chem.**, v.41, p.103-106, 1993.
- NAKAMURA, T., UTSUMI, S., MORI, T. Mechanism of heat-induced gelation and gel properties of soybean 7S globulin. **Agric. Biol. Chem.**, v.50, p.1287-1293, 1986.
- NIELSEN, N.C. The chemistry of legume storage proteins. **Phil. Trans. R. Soc. London B**, v.304, p.287-296, 1984.
- O'NEILL, T.E., KINSELLA, J.E. Flavor protein interaction characterization of 2-nonanone binding to isolated soy protein fractions. **J. Food Sci.**, v.52, p.98-101, 1987.
- SAMOTO, M., MIYAZAKI, C., AKASAKA, T. et al. Specific binding of allergenic soybean protein *Gly m Bd 30K* with  $\alpha'$ - and  $\alpha$ -subunits of conglycinin in soy milk. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.60, p.1006-1010, 1996.
- STASWICK, P.E., HERMODSON, M.A., NIELSEN, N.C. Identification of the acidic and basic subunits complexes of glycinin. **J. Biol. Chem.**, v.256, n.16, p.8752-8755, 1981.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F. et al. Enzymatic amplification of B globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1985.

- SCKROCH, P., TIVANG, J., NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. Applications of RAPD technology to plant breeding. In: SIMPOSIUM OF APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING. 1992, Minneapolis. **Proceedings...** Minneapolis: CSSA/ ASHS/ AGA, 1992. p.26-30.
- THANH, V.H., SHIBASAKI, K. Beta-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms. **Biochim. Biophys. Acta**, v.490, n.2, p.370-384, 1977.
- WELSH, J., MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucl. Acids Res.**, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELICK, A.R., LIVAK, K.J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.**, v.18, p.6531-6535, 1990.
- WOLF, W.J. Lipoyxygenase and flavor of soybean protein products. **J. Agric. Food Chem.**, v.23, n.2, p.136-141, 1975.
- YOUNG, N.D., ZAMIR, D., GANAL, M.W. et al. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the *Tm-2a* gene in tomato. **Genetics**, v.120, p.579-585, 1988.

**EFEITO DA ELIMINAÇÃO GENÉTICA DE LIPOXIGENASES  
E DE POLIPEPTÍDEOS DE RESERVA NA QUALIDADE  
DA SOJA PARA A AGROINDÚSTRIA**

**ABSTRACT**

To study the effects of the genetic elimination of seed lipoxygenases (LOX) and of the storage proteins subunits  $\alpha'$  and G4 on the quality of soybeans as a source of protein for human and animal consumption, crosses were made between line UFV91.751 (LOX2 and 3 - less) with Keburi ( $\alpha'$  - less) and PBTN (a line devoid of all seed lipoxygenases and the G4 subunit). Selected F<sub>2</sub> seeds lacking LOX with and without  $\alpha'$  and G4 subunits were sown in the green house. Seeds derived from the F<sub>2</sub> plants, from their progenitors and from the Cristalina cultivar were analyzed for protein, lipids, amino acids, fatty acids and storage protein subunits contents, and hexanal production. Genetic elimination of LOX,  $\alpha'$  and G4 subunits did not promote reduction of the seed protein content as determined by the Kjeldhal method and of the seed storage proteins 7S and 11S content estimated by scanning SDS-PAGE gels of the crude soybean seed extracts. Genetic elimination of LOX did promote a great reduction of hexanal production, one of the compounds most related to the grassy-beany taste of soybean protein based products. Genetic elimination of  $\alpha'$  subunit seems to be related with reduction of methionine content of the soybean protein. These data could be explained by the higher synthesis of the lower methionine content subunits ( $\alpha$  and  $\beta$ ) components of the soybean storage protein  $\beta$ -conglycinin. On the other hand, the genetic elimination of G4 subunit is related with the improvement of methionine content of the soybean protein. This observation could also be explained by the preferential synthesis of the higher methionine content subunits (G1, G2 and G3) of glycinin, one of the major storage protein found in soybean seeds.

**RESUMO**

Objetivando verificar o efeito da eliminação genética de lipoxigenases (LOX) e dos polipeptídeos de reserva  $\alpha'$  e G4 na qualidade da soja para a agroindústria, realizaram-se cruzamentos entre os genótipos UFV91.751 (que não apresenta as isoenzimas LOX2 e LOX3), Keburi (que não apresenta a subunidade  $\alpha'$ ) e PBTN (que não apresenta as três isoenzimas lipoxigenases e a subunidade G4). Selecionaram-se sementes F<sub>2</sub> sem as três LOX, com presença e, ou, ausência de  $\alpha'$  e G4, que a seguir foram plantadas em casa de vegetação. Nas sementes dessas linhagens selecionadas, de seus progenitores e da variedade Cristalina foram analisados os teores de proteína total, de lipídio, de aminoácidos, de ácidos graxos e das subunidades componentes das proteínas de reserva, além da produção de hexanal. A eliminação genética de lipoxigenases e das subunidades  $\alpha'$  e G4 não promoveu redução nos teores de proteína total determinado pelo método de Kjeldhal ou das proteínas de reserva 7S e 11S das sementes de soja, estimados por densitometria de géis SDS-PAGE desenvolvidos com proteínas totais extraídas das sementes de soja. A eliminação genética de lipoxigenases de sementes promoveu redução drástica na produção de hexanal, um dos principais compostos responsáveis pelos sabores característicos de produtos protéicos derivados de soja, o que é um indicativo da melhoria de sabor para consumo humano nos genótipos sem lipoxigenases nas sementes. Observou-se diminuição do teor de metionina com a eliminação genética de  $\alpha'$ . Esses dados podem ser explicados pelo aumento verificado na síntese de subunidades de  $\beta$ -conglucina com menores teores de metionina ( $\alpha$  e  $\beta$ ). Por outro lado, observou-se aumento do teor de metionina na proteína da soja com a eliminação genética da subunidade G4. Esses resultados também foram justificados pela observação de uma maior síntese nestes genótipos de subunidades componentes de glicina (G1, G2 e G3) com maiores conteúdos de metionina.

## INTRODUÇÃO

Em geral, o consumo de produtos protéicos derivados da soja é pequeno, devido à presença de sabores característicos (“beany flavor”) e teores reduzidos de aminoácidos sulfurados. Tem-se atribuído à atividade da enzima lipoxigenase (EC 1.13.11.12) o desenvolvimento do “beany flavor” em produtos protéicos de soja (Rackis *et al.*, 1979).

Lipoxigenases catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos poliinsaturados que apresentam na sua estrutura o grupo 1,4-cis, cis-pentadieno, produzindo hidroperóxidos que, por reações subsequentes, geram compostos carbonílicos de cadeia curta constituintes do “beany flavor” (Wolf, 1975). Tratamentos térmicos visando à inativação de lipoxigenases antes ou durante o processamento industrial da soja e extração dos compostos responsáveis pelo “beany flavor” com solventes orgânicos em produtos derivados apresentam-se dispendiosos e não satisfatórios (Wolf, 1975; Kinsella, 1979; Kitamura *et al.*, 1983).

Em sementes de soja geralmente são encontradas três isoenzimas de lipoxigenase, denominadas lipoxigenase 1 (LOX 1), lipoxigenase 2 (LOX 2) e lipoxigenase 3 (LOX 3) (Axelrod *et al.*, 1981). Entretanto, encontram-se no germoplasma mundial de soja genótipos com ausência de LOX 1 (PI 133226 e PI 408251) (Hildebrand e Hymowitz, 1981), de LOX 2 (PI 86023) (Kitamura, 1984) e de LOX 3 (Wasenatsu e Ichigowase) (Kitamura *et al.*, 1983). Linhagens com ausência de LOX 1, LOX 2, LOX 3, LOX 1 e 3, LOX 2 e 3 foram obtidas por retrocruzamentos com variedades comerciais (Kitamura *et al.*, 1985; Davies e Nielsen, 1987; Moreira *et al.*, 1993). Apesar da estreita ligação entre os genes que codificam LOX 1 e 2, tratamentos de populações F<sub>2</sub> de cruzamentos entre linhagem sem LOX 1 e 3 com linhagem sem LOX 2 e 3, com radiações gama, permitiram a obtenção e seleção de materiais genéticos com ausência de LOX 1 e 2 e com ausência completa de lipoxigenases em suas sementes (Hajika *et al.*, 1991).

As proteínas de soja constituem cerca de 35 a 45% da matéria seca da semente. As proteínas de reserva, glicinina (11S) e β-conglicinina (7S), representam em torno de 70% da proteína do

grão de soja (Hill e Breidenbach, 1974). Os polipeptídeos constituintes da glicinina e  $\beta$ -conglucina diferem em seus conteúdos de metionina (Moreira *et al.*, 1979; Coates *et al.*, 1985).

A glicinina apresenta massa molecular de aproximadamente 350 kDa, sendo constituída por polipeptídeos de caráter ácido e de caráter básico. Foram isolados da glicinina seis polipeptídeos ácidos (A1a, A1b, A2, A3, A4 e A5) e cinco básicos (B1a, B1b, B2, B3 e B4) que se encontram associados de modo específico, por meio de ligações bissulfídicas, entre um ácido e um básico (Moreira *et al.*, 1979, 1981). Os polipeptídeos A1a, A1b, A2, B1 e B2 possuem de três a seis vezes mais metionina que A3, A4, A5, B3 e B4 (Moreira *et al.*, 1979).

Os polipeptídeos ácidos e básicos da glicinina estão associados por ligações bissulfídicas específicas, formando as subunidades A1aB2, A1bB1b, A2B1a, A3B4 e A5B3 (Moreira *et al.*, 1979, 1981). O polipeptídeo A4 está associado ao B3, por meio de ligações não covalentes, formando a subunidade A5A4B3 (Staswick *et al.*, 1981). Atualmente, essas subunidades são denominadas G1 (A1aB2), G2 (A1bB1b), G3 (A2B1a), G4 (A5A4B3) e G5 (A3B4) e seus genes *Gy1*, *Gy2*, *Gy3*, *Gy4* e *Gy5*. Em glicinina têm sido observadas variações na composição polipeptídica, como mutantes naturais com ausência do complexo G4 (Fontes e Moreira, 1984).

A  $\beta$ -conglucina é uma glicoproteína com massa molecular estimada em 150-170 kDa e possui três subunidades,  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo codificadas pelos genes *Cgy1*, *Cgy2* e *Cgy3*, respectivamente (Thanh e Shibasaki, 1977). As subunidades  $\alpha$  e  $\alpha'$  possuem dois e três resíduos de metionina, respectivamente, e a subunidade  $\beta$  não possui esse aminoácido (Coates *et al.*, 1985). Existe polimorfismo genético na composição polipeptídica de  $\beta$ -conglucina, tendo sido identificado genótipo com ausência de  $\alpha'$  (Kitamura *et al.*, 1984). Recentemente foi demonstrado que a proteína *Gly m Bd 30K*, principal fator alergênico da soja, liga-se, especificamente, às subunidades  $\alpha'$  e  $\alpha$  da  $\beta$ -conglucina por meio de ligações bissulfídicas, durante o preparo de extratos hidrossolúveis de soja, tornando, portanto, desejável o desenvolvimento

de genótipos de soja contendo menores teores dessas subunidades (Samoto *et al.*, 1996).

Este trabalho teve como objetivo eliminar geneticamente as isoenzimas lipoxigenases e as subunidades protéicas  $\alpha'$  e G4 das sementes de soja, bem como verificar o efeito dessa eliminação genética na qualidade protéica e no sabor de sementes de linhagens de soja.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Materiais Genéticos:** Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) - UFV91.751 e Paranaíba Triplo Nulo (PBTN) - e uma variedade denominada Keburi.

A linhagem UFV91.751 apresenta ausência das isoenzimas LOX 2 e 3, é heterogênea para presença de G4 e apresenta  $\alpha'$  ( $Lx_1Lx_1lx_2lx_2lx_3lx_3Gy_4\_Cgy_1Cgy_1$ ), enquanto PBTN apresenta ausência completa de lipoxigenases e G4 e possui  $\alpha'$  ( $lx_1lx_1lx_2lx_2lx_3lx_3gy_4gy_4Cgy_1Cgy_1$ ). Ambas as linhagens são resultantes de cruzamentos entre variedades comerciais brasileiras e genótipos sem LOX, do Programa de Melhoramento da Qualidade e do Sabor da Soja em desenvolvimento na Universidade Federal de Viçosa. A variedade Keburi apresenta ausência da subunidade  $\alpha'$  ( $Lx_1Lx_1Lx_2Lx_2Lx_3Lx_3Gy_4Gy_4cgy_1cgy_1$ ).

Inicialmente foram realizados cruzamentos entre 'UFV91.751' (progenitor feminino) e 'Keburi' (progenitor masculino), com o objetivo de obter um genótipo com ausência da isoenzima LOX3 e da subunidade  $\alpha'$ . A efetividade dos cruzamentos foi verificada pelo teste de oxidação do  $\beta$ -caroteno (Kikuchi e Kitamura, 1987). As sementes F<sub>1</sub>, provenientes dos cruzamentos, foram colocadas em germinador a 27°C, no claro. Após 72h, as plântulas foram transplantadas para vasos com 2,8l de substrato solo:areia:esterco bovino (3:1:1, v:v:v) e permitiu-se a autofecundação em casa de vegetação. As sementes F<sub>2</sub> obtidas foram

submetidas a análises não destrutivas de detecção de LOX $\alpha$ 2 e LOX $\alpha$ 3 (testes colorimétricos) e da subunidade protéica  $\alpha'$  (eletroforese SDS-PAGE). Plantas F<sub>2</sub>, originadas de sementes que apresentaram ausência de LOX $\alpha$ 3 e  $\alpha'$ , foram cruzadas com a linhagem PBTN (progenitor feminino), objetivando obter genótipos com ausência de LOX,  $\alpha'$  e G4. A efetividade dos cruzamentos foi monitorada por meio da presença de LOX $\alpha$ 1, pelo teste de oxidação do iodeto (Hammond *et al.*, 1992). As sementes F<sub>1</sub> foram germinadas em germinador e transplantadas para casa de vegetação. Fragmentos das sementes F<sub>2</sub> foram analisadas para seleção daquelas com ausência completa de lipoxigenases (testes colorimétricos) e seleção de sementes com ausência de  $\alpha'$  e de G4 (eletroforese SDS-PAGE). Sementes triplo-nulas com presença de  $\alpha'$  e, ou, G4 foram selecionadas na geração F<sub>3</sub>, oriundas de plantas F<sub>2</sub> com ausência de lipoxigenases que apresentaram as subunidades  $\alpha'$  e, ou, G4.

**Análises de Lipoxigenases:** Foram utilizados testes colorimétricos e não destrutivos para detecção de LOX $\alpha$ 1, LOX $\alpha$ 2 (Hammond *et al.*, 1992) e LOX $\alpha$ 3 (Kikuchi e Kitamura, 1987), tomando-se uma pequena porção do cotilédone, do lado oposto ao eixo embrionário, de sementes F<sub>1</sub>, para confirmação dos cruzamentos, e de sementes F<sub>2</sub>, para seleção de indivíduos com ausência de lipoxigenases.

**Análise das Subunidades  $\alpha'$  e G4:** As proteínas de reserva de sementes de soja foram extraídas de fragmentos de cotilédones (de 10 a 15 mg) e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, segundo Laemmli (1970). Para detectar a subunidade  $\alpha'$  em sementes F<sub>2</sub> do cruzamento ('UFV91.751' x 'Keburi'), utilizou-se tampão de extração Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo 2% de SDS. As proteínas foram separadas em gel contendo 10% de poliacrilamida e 0,1% de SDS. A eletroforese foi desenvolvida a 80 volts durante 1,5 h, sendo as bandas protéicas reveladas com Coomassie blue R-250.

Para detecção das subunidades  $\alpha'$  e G4 nas sementes F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> com ausência de lipoxigenases, do cruzamento [‘PBTN’ $\times$  (‘UFV91.751’ $\times$  ‘Keburi’)], foi utilizado tampão de extração Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo 0,2% de SDS, 10 mM de 2-mercaptoetanol e 6 M de uréia. O gel de separação continha 12% de poliacrilamida, 5 M de uréia, Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 e 0,1% de SDS. A eletroforese foi conduzida a 150 volts durante 4 h. As bandas protéicas foram verificadas como descrito anteriormente.

**Análise da Concentração Relativa das Subunidades das Proteínas de Reserva:** Nesses experimentos as subunidades das proteínas de reserva foram separadas em géis de poliacrilamida em gradiente de 10 a 18% e de 4,42 a 5,45 M de uréia (Fontes *et al.*, 1984). As bandas protéicas foram evidenciadas como anteriormente descrito. A imagem do gel foi fotodocumentada em equipamento EagleEye II (Stratagene), e analisada com “software” One DScan (Scanalytics). Foram computadas, em quatro repetições, as densidades relativas de cada uma das bandas componentes das proteínas de reserva e estimadas as proporções de proteínas de reserva na proteína total. Também foram estimadas a relação entre as duas principais proteínas de reserva, glicinina e  $\beta$ -conglucina, e a proporção de polipeptídeos “GA” (subunidades G1, G2, G3 e B4, o polipeptídeo básico da subunidade G5) e “GB” (subunidade G4 e A3, o polipeptídeo ácido da subunidade G5) da glicinina.

**Determinação do Teor de Proteína Total:** Para análise da proteína total utilizou-se o método de Kjeldahl (Association of Official Analytical Chemists - AOAC, 1975), quantificando-se o nitrogênio total, que foi multiplicado pelo fator 6,25, para conversão do teor de nitrogênio em teor de proteína. Foram analisadas três repetições para cada genótipo, em amostras contendo cerca de 0,3 g de soja moída em moinho do tipo “Willey” e passadas em peneira de 20 mesh.

**Determinação do Teor de Lipídios:** Os lipídios foram extraídos a frio, em extrator de Soxhlet, utilizando-se éter de petróleo durante 10 h. Os teores de lipídios foram obtidos pela diferença de peso dos balões de extração antes de iniciado o processo de extração e após secagem em estufa, até peso constante, segundo normas analíticas descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Foram analisadas três amostras de sementes moídas de cada genótipo, com cerca de 3 g.

**Determinação da Composição de Ácidos Graxos:** A composição de ácidos graxos foi obtida por cromatografia gasosa (Bubeck *et al.*, 1989). Foi utilizado o óleo extraído a frio com éter de petróleo como solvente, durante 4 h. Após eliminação do solvente com N<sub>2</sub>, tomou-se alíquota de 2 µl de óleo, à qual foi adicionado 0,4 ml de metóxido de sódio 1 M, deixando-se reagir por cerca de 1 h, a 30 °C, em banho-maria. Adicionou-se 1 ml de água destilada e 1 ml de hexano, deixando-se em repouso durante 1 h, no escuro. Retirou-se 0,25 ml do sobrenadante ao qual foi adicionado 0,75 ml de hexano, injetando-se a mistura em cromatógrafo a gás, modelo GC17A (Shimadzu), equipado com integrador CR-7A. Foi utilizada uma coluna Carbowax (0,32 mm de diâmetro interno x 30 m de comprimento). As programações da coluna, do injetor e do detector foram isotérmicas a 225 °C, 240 °C e 280 °C, respectivamente. O fluxo do gás de arraste foi de 1,1 ml/min. Efetuaram-se duas repetições por genótipo.

**Determinação da Composição de Aminoácidos:** De cada genótipo foram analisadas duas repetições de amostras de sementes de soja moídas em moinho do tipo “Willey” e passadas em peneira de 100 mesh. A farinha obtida foi desengordurada em extrator de Soxhlet e liofilizada. Adicionalmente foram analisados os teores de proteína total e de umidade deste material, para permitir a expressão dos resultados em percentagem de aminoácidos na proteína. Os aminoácidos foram analisados por cromatografia de troca iônica, após hidrólise ácida com HCl 6 N, por 22 h, a 110 °C (Spackman *et al.*, 1958), no Centro

Interdepar-amental de Química de Proteínas, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

**Determinação de Hexanal:** Foi utilizada cromatografia gasosa por "head-space"; em cromatógrafo Shimadzu, modelo GC14B, equipado com "head-space", modelo 2B e integrador CR-7A. Analisaram-se, em três repetições, amostras de sementes de 0,5 g, que foram misturadas em 2 ml de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0, a 30°C, sendo mantidas a 45°C durante 15 min e, em seguida, injetadas em coluna Carbowax (0,53 mm de diâmetro interno x 25 m de comprimento). Nas condições das análises efetuadas, a temperatura inicial da coluna foi de 45°C, com acréscimos de 7°C/min até 70°C, manutenção a 70°C durante 5 min e acréscimos de 15°C até atingir a temperatura de 200°C. As temperaturas do injetor e detector de ionização de chama foram programadas para 150°C e 220°C, respectivamente. O fluxo do gás de arraste foi regulado para 5,8 ml/min.

**Determinação do Teor de Umidade:** O teor de umidade das sementes dos genótipos de soja foram determinados, em três repetições, por diferença de peso após secagem em estufa a 105°C, conforme normas analíticas descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Assim, os teores de proteína, lipídios e ácidos graxos foram expressos com base na matéria seca das sementes.

**Análises Estatísticas:** Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. Para a análise estatística dos dados obtidos, comparam-se as médias por meio do teste de Duncan, a 5% de significância. Foram comparadas todas as médias de teores de proteína total, lipídios, aminoácidos, ácidos graxos e subunidades componentes das proteínas de reserva, e as de produção de hexanal.

Também, foram aplicados testes de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para confirmar a segregação mendeliana do fenótipo presença/ausência de

LOX $\alpha$ 1, 2 e 3 e das subunidades  $\alpha'$  e G4, componentes das proteínas de reserva.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sementes de soja, da geração F<sub>2</sub>, obtidas a partir do cruzamento entre a linhagem UFV91.751 e a variedade Keburi, foram selecionadas para ausência de LOX $\alpha$ 3 e LOX $\alpha$ 2 e 3. De um total de 379 sementes analisadas, 266 apresentaram LOX $\alpha$ 3 e 113 não possuíam esta isoenzima. Dentre estas 113 sementes, descartaram-se 5; e verificou-se que das 108 sementes com ausência de LOX $\alpha$ 3, 76 possuíam LOX $\alpha$ 2, enquanto 32 mostraram ausência desta isoenzima (Tabela 1).

Utilizou-se o teste de  $\chi^2$  para verificar o ajustamento das freqüências observadas às proporções previstas de segregação mendeliana de 3:1 para herança monogênica.

Os altos valores de  $\chi^2$  obtidos e, portanto, baixos valores de nível de probabilidade verificados para as freqüências observadas e esperadas para presença e ausência de LOX $\alpha$ 2 e 3, nas sementes F<sub>2</sub> do cruzamento ('UFV91.751' x 'Keburi'), provavelmente, ocorreram devido ao pequeno número de sementes disponíveis para análise e à atribuição de ausência de LOX às sementes cujos resultados foram duvidosos. Posteriormente foram realizadas análises para detecção de ausência de subunidades protéicas e evitaram-se descartes de sementes potencialmente sem LOX $\alpha$ 2 e 3, o que provocaria diminuição no número de sementes. Além disso, foi considerado que o caráter ausência de LOX seria recuperado no cruzamento posterior com 'PBTN', que apresenta ausência completa de lipoxigenases em suas sementes.

Tabela 1 - Freqüências observadas e esperadas (3:1) de sementes de soja sem lipoxigenases 1, 2 e 3 em sementes F<sub>2</sub> dos cruzamentos ('UFV91.751' x 'Keburi') e ['PBTN' x ('UFV 91.751' x 'Keburi')]; valor de  $\chi^2$  calculado; e nível de probabilidade

Genótipo	Freqüência		$\chi^2$	Probabilidade
	observada	esperada		
..... 'UFV91.751' x 'Keburi' .....				
<i>LX<sub>3</sub>_</i>	266,00	284,25	4,6868	0,05 - 0,02
<i>lx<sub>3</sub> lx<sub>3</sub></i>	113,00	94,75		
<i>LX<sub>2</sub>_lx<sub>3</sub> lx<sub>3</sub></i>	76,00	81,00	1,2345	0,05 - 0,02
<i>lx<sub>2</sub> lx<sub>2</sub> lx<sub>3</sub> lx<sub>3</sub></i>	32,00	27,00		
..... 'PBTN' x ('UFV91.751' x 'Keburi') .....				
<i>LX<sub>1</sub>_ LX<sub>2</sub>_ lx<sub>3</sub> lx<sub>3</sub></i>	1.818,00	1.820,25	0,0482	0,90 - 0,80
<i>lx<sub>1</sub> lx<sub>1</sub> lx<sub>2</sub> lx<sub>2</sub> lx<sub>3</sub> lx<sub>3</sub></i>	612,00	606,75		

De um total de 2.430 sementes F<sub>2</sub> do cruzamento ['PBTN' x ('UFV91.751' x 'Keburi')] foram selecionadas 1.818 que apresentavam LOX1 e 612 com ausência desta isoenzima.

A estreita ligação entre os genes que codificam LOX1 e LOX2 foi útil no processo de seleção de sementes para a obtenção de linhagens sem lipoxigenases nas sementes (triplo-nulas). Durante a seleção para ausência de subunidades de proteína de reserva, por eletroforese em gel de poliacrilamida, observou-se que das sementes F<sub>2</sub> do cruzamento ['PBTN' x ('UFV91.751' x 'Keburi')] todas aquelas com ausência de LOX 1 apresentaram ausência simultânea de LOX2.

Os resultados de segregação apresentados na Tabela 1 também indicam que a presença de cada isoenzima, LOX1, 2 e 3, é condicionada por um gene simples e dominante, de acordo com os resultados encontrados na literatura (Kitamura *et al.*, 1985; Hajika *et al.*, 1991, 1992; Moreira *et al.*, 1993).

Por meio dos resultados da análise eletroforética das subunidades das proteínas de reserva das sementes  $F_2$  dos cruzamentos ('UFV91.751'x'Keburi') e ['PBTN'x('UFV91.751'x'Keburi')] foi possível identificar a herança das subunidades  $\alpha'$  e G4, componentes das proteínas de reserva. De um total de 104 sementes  $F_2$  originárias do cruzamento ('UFV91.751'x'Keburi') verificou-se que 82 apresentaram a subunidade  $\alpha'$  e 22 não a apresentaram, enquanto de um total de 74 sementes  $F_2$  verificaram-se 59 com a subunidade G4 e 15 sem G4.

Em relação às sementes  $F_2$  do cruzamento ['PBTN'x('UFV91.751'x'Keburi')], de um total de 361 sementes analisadas, verificou-se que 276 apresentaram a subunidade  $\alpha'$  e 85 sementes não a apresentaram e, de um total de 229 sementes analisadas, 176 apresentaram a subunidade G4 e 53 apresentaram ausência desta subunidade (Tabela 2). Dentre as 53 sementes triplo-nulas com ausência da subunidade G4, verificaram-se 15 com ausência e 38 com presença de  $\alpha'$ , enquanto nas 176 sementes triplo-nulas apresentando a subunidade G4 verificaram-se 132 com presença da subunidade  $\alpha'$  e 42 sem esta subunidade.

Os resultados evidenciados na Tabela 2 mostram que os genes que codificam as subunidades  $\alpha'$  e G4 apresentam segregação mendeliana simples.

Resultados similares já haviam sido relatados na literatura, com descrição de mutantes naturais com ausência de  $\alpha'$  (Kitamura *et al.*, 1984) e ausência de G4 (Fontes e Moreira, 1984).

As sementes  $F_2$  triplo-nulas do cruzamento ['PBTN'x('UFV91.751'x'Keburi')] com presença de  $\alpha'$  e, ou, G4 foram plantadas em casa de vegetação e pelo menos 12 sementes  $F_3$  de cada planta foram analisadas em gel de poliacrilamida para verificar se havia segregação para estas subunidades. Somente as sementes de plantas homocigotas foram utilizadas para as análises posteriores.

Tabela 2 - Frequências observadas e esperadas (3:1) de sementes de soja sem  $\alpha'$  e G4 em sementes F<sub>2</sub> sem LOX<sup>3</sup> (*lx<sub>3</sub> lx<sub>3</sub>*), do cruzamento ('UFV 91.751' x 'Keburi'), e triplo-nulas (TN), do cruzamento ['PBTN' x ('UFV 91.751' x 'Keburi')]; valor de  $\chi^2$  calculado; e nível de probabilidade

Genótipo	Frequência		$\chi^2$	Probabilidade
	observada	esperada		
..... 'UFV 91.751' x 'Keburi' .....				
<i>lx<sub>3</sub> lx<sub>3</sub> Cgy<sub>1</sub> -</i>	82,00	78,00	0,4102	0,70-0,50
<i>lx<sub>3</sub> lx<sub>3</sub> cgy<sub>1</sub> cgy<sub>1</sub></i>	22,00	26,00		
<i>lx<sub>3</sub> lx<sub>3</sub> Gy<sub>4</sub> -</i>	59,00	55,50	0,4414	0,70-0,50
<i>lx<sub>3</sub> lx<sub>3</sub> gy<sub>4</sub> gy<sub>4</sub></i>	15,00	18,50		
..... PBTN x ('UFV 91.751' x 'Keburi') .....				
TN <i>Cgy<sub>1</sub> -</i>	276,00	262,50	0,4072	0,70-0,50
TN <i>cgy<sub>1</sub> cgy<sub>1</sub></i>	85,00	87,50		
TN <i>Gy<sub>4</sub> -</i>	176,00	171,75	0,4206	0,70-0,50
TN <i>gy<sub>4</sub> gy<sub>4</sub></i>	53,00	57,25		

Os progenitores utilizados nos cruzamentos e linhagens triplo-nulas (KCPs) - com presença de  $\alpha'$  e G4 (KCP 1), presença de  $\alpha'$  e ausência de G4 (KCP 2), ausência de  $\alpha'$  e presença de G4 (KCP 3) e ausência de  $\alpha'$  e G4 (KCP 4) - derivadas destes cruzamentos foram plantados em casa de vegetação na mesma época, portanto em condições ambientais semelhantes durante o crescimento e desenvolvimento das plantas. Na colheita, as sementes foram agrupadas, formando os lotes de sementes para cada genótipo. Também foi plantada a variedade Cristalina como padrão de variedade comercial, por ser uma das mais cultivadas nas principais regiões produtoras do País e por ser um dos ancestrais da linhagem UFV 91.751.

Entre os genótipos analisados (Cristalina, Keburi, UFV 91.751, PBTN e as quatro linhagens KCPs), o teor de proteína total foi maior nos

genótipos KCPs e na linhagem UFV91.751. A variedade Cristalina apresentou o menor teor protéico e o maior teor de lipídio; enquanto o inverso ocorreu na linhagem UFV91.751, que teve o maior teor de proteína e o menor de lipídio (Tabela 3). Comparando-se os dados de teor de proteína e teor de lipídio, verificou-se uma correlação negativa altamente significativa entre os teores de proteína e óleo ( $r = - 0,8345$ ).

Nas linhagens KCP triplo-nulas com ausência da subunidade G4 não se verificou diminuição no teor de proteína total das sementes (Tabela 3), devendo ter ocorrido compensação da eliminação genética de G4, pela síntese de outros polipeptídeos componentes das proteínas de reserva. Indicações anteriores deste fato foram relatadas por Fontes e Moreira (1984), no trabalho de avaliação de 44 genótipos de soja, dos quais 13 apresentavam ausência de G4, em que não foi possível relacionar a ausência ou presença de G4 com teor de proteína.

A eliminação genética de  $\alpha'$  também parece não ter provocado alteração no teor de proteína (Tabela 3). De modo similar, propõe-se que a ausência desta subunidade seja compensada pela maior síntese de outros polipeptídeos.

Os teores de lipídios não foram alterados em função da eliminação genética de lipoxigenases e subunidades protéicas  $\alpha'$  e G4 (Tabela 3).

Com a eliminação genética de lipoxigenases das sementes, houve diminuição significativa na quantidade de hexanal evoluído. Como pode ser observado na Tabela 3, as variedades Keburi e Cristalina, ambas contendo todas as lipoxigenases da semente, tiveram área de pico de hexanal entre 5 e 7 vezes maior que a linhagem UFV91.751, que possui somente LOX1. As linhagens PBTN e KCP, todas triplo-nulas, não produziram hexanal (Tabela 3).

Na literatura existem relatos de diminuição na evolução de compostos derivados da atividade de LOX, em sementes de linhagens duplo-nulas com ausências de LOX2 e 3 (Moreira *et al.*, 1993) e em sementes de linhagens triplo-nulas com ausência completa de lipoxigenases (Yukawa *et al.*, 1995; Furuta *et al.*, 1996).

Tabela 3 - Teores de proteína total e de lipídios e produção de hexanal (área do pico) em sementes de genótipos de soja

Genótipo	Proteína ----- % -----	Lipídio	Hexanal --- mv ---
Cristalina	37,72 c	23,55 a	497,00 a
Keburi	39,82 b	19,62 c	335,67 b
UFV 91.751	43,03 a	15,22 f	68,33 c
PBTN	38,51 bc	20,36 b	0,00 d
KCP 1	42,61 a	17,96 e	0,00 d
KCP 2	42,15 a	18,68 d	0,00 d
KCP 3	38,94 bc	19,62 c	0,00 d
KCP 4	42,23 a	18,15 e	0,00 d
Média	40,63	19,15	112,63
C.V. (%)	1,78	0,98	17,33

Médias, na coluna, com mesmas letras não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

O efeito da eliminação genética de isoenzimas lipoxigenases de sementes de soja tem sido relacionado com a diminuição de produção de compostos responsáveis pelo sabor característico da soja em seus produtos protéicos derivados. A análise da evolução de hexanal, da produção de aldeídos totais ou de compostos carbonílicos totais em produtos de soja tem sido usada como indicativo da melhoria do sabor característico da soja. Nesse sentido, a evolução de hexanal em farinhas de soja é aceita pelos pesquisadores da área como indicador da presença de sabores característicos da soja, devido ao seu baixo valor “threshold”, ou limiar de percepção sensorial (Wolf, 1975; Rackis *et al.*, 1979), além de terem sido verificadas boas correlações entre teor de hexanal e outros compostos responsáveis pelo “beany flavor” (Moreira *et al.*, 1993; Yukawa *et al.*, 1995; Furuta *et al.*, 1996).

Com relação à composição de ácidos graxos, foram verificadas variações dos teores dos ácidos palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico entre os genótipos analisados. A variedade Keburi apresentou o maior teor de ácido oléico e, conseqüentemente, teor mais reduzido de ácido linoléico; o inverso ocorreu com a variedade Cristalina. Verificou-se, também, que na variedade Keburi ocorreram os menores teores dos ácidos palmítico e linoléico; já a variedade Cristalina apresentou o maior teor de ácido linoléico (Tabela 4). No entanto, os teores verificados estão dentro da amplitude de variação encontrada na maioria das variedades comerciais brasileiras (Visentainer *et al.*, 1991).

Os maiores teores de aminoácidos encontrados por meio de cromatografia de troca iônica foram de glutâmico+glutamina, aspártico+asparagina, arginina, leucina e lisina em todos os genótipos analisados. Estes aminoácidos representaram mais que 50% da composição das proteínas das sementes (Tabela 5). Por outro lado, verificaram-se baixos teores de aminoácidos sulfurados (menos que 5%). Resultados semelhantes foram também encontrados por Grabau *et al.* (1986), Zarkadas *et al.* (1993) e Cabral *et al.* (1995) e expressam a composição típica da proteína de reserva de sementes de soja.

Todos os aminoácidos, exceto a isoleucina, apresentaram variações entre os genótipos analisados. Porém, a variação importante reside naqueles considerados essenciais para humanos e animais monogástricos (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina), destacando-se, entre eles, o aminoácido metionina. O aminoácido cisteína, torna-se essencial quando o suprimento de metionina não é adequado (Mathews e Holde, 1990; Friedman, 1996).

Tabela 4 - Composição percentual de ácidos graxos na fração lipídica de sementes de genótipos de soja

Genótipo	Palmítico	Esteárico	Oléico	Linoléico	Linolênico
Cristalina	10,93 ef	3,04 b	20,30 e	58,92 a	6,82 f
Keburi	10,80 f	2,94 c	33,23 a	45,60 f	7,43 e
UFV 91.751	12,68 a	3,20 a	18,42 g	55,76 c	9,95 b
PBTN	11,19 de	2,93 c	20,60 cd	56,55 b	8,73 d
KCP 1	11,64 bc	2,46 d	20,42 de	54,76 d	10,72 a
KCP 2	11,46 cd	2,91 c	23,95 b	52,74 e	8,95 cd
KCP 3	12,76 a	3,04 b	19,60 f	54,85 d	9,75 b
KCP 4	11,85 b	3,08 b	20,78 c	55,05 d	9,23 c
Média	11,66	2,95	22,16	54,28	8,95
C. V. (%)	1,07	0,93	0,42	0,27	2,24

Médias, na coluna, com mesmas letras não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Entre os genótipos analisados verificou-se que a variedade Cristalina, além de ter apresentado o menor teor de proteína total, também apresentou os menores teores de metionina e cisteína (Tabelas 5 e 6), enquanto a linhagem PBTN apresentou os maiores teores destes dois aminoácidos.

Entre os progenitores utilizados nos cruzamentos, PBTN apresentou o maior teor de metionina e a linhagem UFV91.751, teor de metionina intermediário entre Keburi e PBTN. Com relação ao aminoácido cisteína, não se verificou diferença entre os teores apresentados pelos progenitores Keburi e UFV91.751 (Tabela 6).

No geral, os teores de metionina dos genótipos com presença de  $\alpha'$  (PBTN, UFV91.751, KCP1, e KCP2) foram maiores do que aqueles verificados nos genótipos com ausência de  $\alpha'$  (Keburi, KCP3 e KCP4). Entre as linhagens KCP que possuem a subunidade G4 (KCP1 e 3), diferindo apenas pela presença/ausência de  $\alpha'$ , a linhagem KCP3 apresentou menor concentração de metionina que KCP1. Dessa forma, conclui-se que a eliminação genética de  $\alpha'$  promove diminuição da concentração de metionina (Tabela 6).



Tabela 6 - Concentração de metionina e cisteína (g/100g de proteína) em genótipos de soja

Genótipo	$\alpha'$	G4	Metionina	Cisteína	Met + Cys
PBTN	Presente	Ausente	2,34 a	1,96 a	4,30 a
UFV 91.751	Presente	Heterogênea	1,98 a	1,31 cd	3,29 b
KCP 2	Presente	Ausente	1,96 b	1,48 c	3,43 b
KCP 4	Ausente	Ausente	1,89 b	1,38 cd	3,27 b
KCP 1	Presente	Presente	1,83 b	1,69 b	3,51 b
KCP 3	Ausente	Presente	1,66 c	1,69 b	3,34 b
Keburi	Ausente	Presente	1,50 c	1,42 cd	2,92 c
Cristalina	Presente	Presente	1,03 d	1,26 d	2,29 d
Média			1,77	1,52	3,30
C. V. (%)			4,01	4,73	3,94

Médias, nas colunas, com mesmas letras não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Por outro lado, observa-se que os teores de metionina das linhagens KCP com presença de G4 (KCP1 e KCP3) foram menores que aqueles das linhagens com ausência de G4 (KCP2 e KCP4). O teor de metionina do genótipo KCP3 (ausência de  $\alpha'$  e presença de G4) foi o menor entre as linhagens. Conclui-se que a eliminação genética de  $\alpha'$  e a manutenção de G4 estão associadas com a redução dos teores de metionina na proteína de sementes (Tabela 6).

O teor de cisteína foi menor nas linhagens sem G4 (KCP2 e KCP4) do que naquelas que apresentam G4 (KCP1 e KCP3). No entanto, a eliminação genética de  $\alpha'$  não parece ter afetado o teor de cisteína, pois foram verificados teores deste aminoácido semelhantes entre as linhagens KCP sem  $\alpha'$  (KCP1 e KCP2) e com  $\alpha'$  (KCP3 e KCP4).

Pode-se observar na Tabela 6 que os teores dos aminoácidos metionina + cisteína não variaram entre as linhagens KCP, pois nas

linhagens em que foram verificados maiores teores de metionina verificou-se menores teores de cisteína.

Por meio da análise de subunidades constituintes das proteínas de reserva, por densitometria do gel, verificou-se que o teor de proteínas de reserva (7S+11S) representou cerca de 73% da proteína total e não variou entre os genótipos analisados (Tabela 7). Entretanto, foram observadas variações na proporção das proteínas de reserva, 7S ( $\beta$ -conglucina) e 11S (glicina), nos genótipos analisados (Tabela 7). A relação 7S/11S foi maior na variedade Cristalina (0,76), que apresentou o menor teor de metionina (1,03), e menor na variedade Keburi, enquanto nos outros genótipos verificaram-se relações similares 7S/11S e intermediárias entre as de Cristalina e Keburi. As relações 7S/11S observadas na proteína de reserva dos genótipos analisados, 0,76 na variedade Cristalina e cerca de 0,5 nos outros genótipos (Tabela 7), foram menores do que os valores publicados na literatura (Cho *et al.*, 1987).

Tabela 7 - Conteúdos relativos de proteína de reserva,  $\beta$ -conglucina (7S), glicina (11S), subunidades de glicina (GA<sup>1/</sup> e GB<sup>2/</sup>), relação 7S/11S e relação GA/GB, obtidos por densitometria de gel

Genótipo	Proteína	7S	11S	7S/11S	GA <sup>1/</sup>	GB <sup>2/</sup>	GA/GB
Cristalina	68,85 a	42,88 a	57,12 c	0,76 a	70,35 c	29,65 a	2,37 d
UFV 91.751	72,45 a	29,69 bc	70,31 ab	0,42 bc	71,24 c	28,76 a	2,48 cd
PBTN	70,95 a	31,70 bc	68,30 ab	0,48 bc	90,35 a	9,65 c	9,37 a
Keburi	76,40 a	26,47 c	73,53 a	0,36 c	78,99 b	21,01 b	3,76 c
KCP 1	76,90 a	29,38 bc	70,62 ab	0,42 bc	77,85 b	22,15 b	3,51 c
KCP 2	73,18 a	32,54 b	67,46 b	0,49 bc	76,08 bc	23,92 ab	3,18 cd
KCP 3	73,33 a	30,59 bc	69,41 ab	0,44 bc	85,97 a	14,03 c	6,13 b
KCP 4	71,10 a	33,47 b	66,53 b	0,51 b	85,05 a	14,95 c	5,69 b
Média	72,89	32,09	67,91	0,48	79,48	20,52	4,6
C.V. (%)	11,00	10,71	5,06	16,34	4,87	18,85	12,36

<sup>1/</sup>: GA indica a soma dos conteúdos relativos das subunidades G1, G2 e G3 e do polipeptídeo B4 da subunidade G5.

<sup>2/</sup>: GB indica a soma dos conteúdos relativos da subunidade G4 e do polipeptídeo A3 da subunidade G5.

Médias, nas colunas, com mesmas letras não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Menores relações 7S/11S são de interesse porque a proteína 11S possui propriedades funcionais, como capacidade de geleificação e firmeza do gel, superiores às da 7S (Nakamura *et al.*, 1986; Kohyama *et al.*, 1992, 1995), e também porque há maior potencial de alergenicidade (Samoto *et al.*, 1996) e maior capacidade de adsorção de compostos responsáveis pelo “off flavor” (O’Neill e Kinsella, 1987) associados à 7S. Entretanto, a relação 7S/11S, além de depender do genótipo, pode ser bastante afetada pelo ambiente, como verificado por Murphy e Resurreccion (1984) e Iwabuchi e Yamauchi (1987).

Entre as linhagens KCP com ausência das subunidades  $\alpha'$  ou G4 não foram verificadas alterações nos teores das proteínas de reserva 7S e 11S, expressas pela relação 7S/11S. A eliminação genética de  $\alpha'$  não promoveu diminuição nos teores de  $\beta$ -conglucina (Figura 1). A proteína de reserva  $\beta$ -conglucina é trimérica, composta por três subunidades principais ( $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ ), que diferem em seu conteúdo de metionina. As subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  apresentam três, dois e nenhum resíduo de metionina, respectivamente (Coates *et al.*, 1985). A diminuição no teor de metionina observada nas linhagens sem  $\alpha'$  (KCP3 e KCP4) pode ser explicada pelo fato de ter ocorrido, por compensação, aumento na síntese e acúmulo da subunidade  $\alpha$ , que possui menor teor de metionina, e da subunidade  $\beta$ , que não possui este aminoácido.

Na tentativa de explicar diferentes teores de metionina nas linhagens que apresentaram relações 7S/11S similares, determinaram-se os teores e as relações entre as subunidades de glicina com maiores conteúdos de metionina (GA) e as com menores conteúdos desse aminoácido (GB). Observa-se na Tabela 7 que a maioria dos genótipos que apresentaram maiores teores de metionina foram aqueles que também apresentaram maiores relações GA/GB, isto é, maior proporção de subunidades da proteína glicina com maiores conteúdos de metionina.

Na estrutura da proteína glicinina (hexâmero) são identificadas cinco subunidades denominadas G1, G2, G3, G4 e G5. As subunidades G1, G2 e G3 possuem 7, 7 e 8 resíduos de metionina, enquanto as subunidades G4 e G5 apresentam 2 e 1 resíduos de metionina, respectivamente (Moreira *et al.*, 1979, 1981; Nielsen *et al.*, 1981; Staswick *et al.*, 1981).

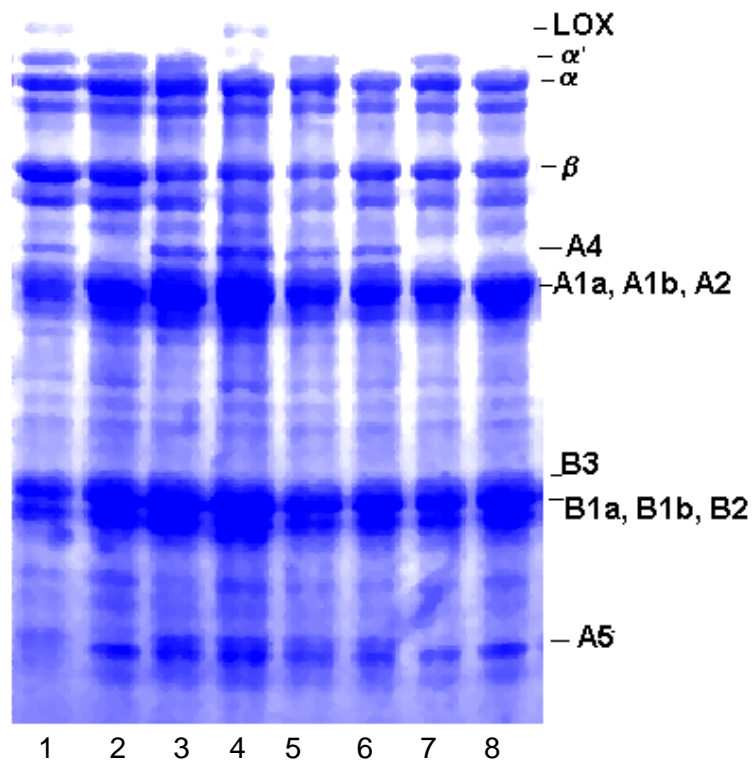


Figura 1 - Eletroforese, em gel de poliacrilamida com uréia, das subunidades das proteínas de reserva de sementes de soja dos genótipos (1) Cristalina, (2) PBTN, (3) UFV 91.751, (4) Keburi, (5) KCP 1, (6) KCP 3, (7) KCP 2 e (8) KCP 4 (em cada canaleta foram aplicados 125 µg de proteína).

## CONCLUSÕES

A eliminação genética de LOX,  $\alpha'$  ou G4 não promoveu redução nos teores de proteína total ou das proteínas de reserva das sementes de soja. A eliminação genética de LOX promoveu drástica redução na produção de hexanal, um dos principais compostos responsáveis pelos sabores característicos de produtos de soja, indicando melhoria de sabor para consumo humano.

A eliminação genética de  $\alpha'$ , subunidade da proteína  $\beta$ -conglucina, diminuiu o teor de metionina na proteína, pelo aumento da síntese das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da proteína  $\beta$ -conglucina.

A eliminação genética de G4, subunidade da proteína glicina, promoveu aumento no teor de metionina, em razão da maior síntese de subunidades de glicina com maiores conteúdos de metionina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Association of Official Analytical Chemists - AOAC** (1975). *Official methods of analysis*. Washington, D.C. 1.094p.

**Axelrod, B., Cheeseborough, T.M. e Laakso, S.** (1981). Lipoxygenase from soybeans. *Methods Enzymol.* 71: 441-451.

**Bubeck, D.M., Fehr, W.R. e Hammond, E.G.** (1989). Inheritance of palmitic and stearic acid mutants of soybean. *Crop Sci.* 29:652-656.

**Cabral, L.C., Serna-Savidar, S.O., Tinksley, A.M. e Weber, C.W.** (1995). Effects of dehulling, cooking and storage conditions on protein quality and digestibility of soybeans. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 45:41-45.

**Cho, R.K., Iwamoto, M. e Saio, K.** (1987). Determination of 7 S and 11S globulins in ground whole soybeans by near infrared reflectance spectroscopic analysis. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 34:666-672.

**Coates, J.B., Medeiros, J.S., Thanh, V.H. e Nielsen, N.C.** (1985). Characterization of the subunits of  $\beta$ -conglucinin. *Arch. Biochem. Biophys.* 243:184-194.

**Davies, C.S. e Nielsen, N.C.** (1987). Registration of soybean germplasm that lacks lipoxygenase isozymes. *Crop Sci.* 27:370-371.

- Fontes, E.P.B. e Moreira, M.A.** (1984). Variações genéticas na composição polipeptídica da proteína de soja. *Arq. Biol. Tecnol.* 27:319-328.
- Fontes, E.P.B., Moreira, M.A., Davies, C.S. e Nielsen, N.C.** (1984). Urea-elicited changes in relative electrophoretic mobility of certain glycinin and  $\beta$ -conglycinin subunits. *Plant Physiol.* 76:840-842.
- Friedman, M.** (1996). Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *J. Agric. Food Chem.* 44:6-29.
- Furuta, S., Nishiba, Y., Hajika, M., Igita, K. e Suda, I.** (1996). DETBA value and hexanal production with the combination of unsaturated fatty acids and extracts prepared from soybean seeds lacking two or three lipoxygenases isozymes. *J. Agric. Food Chem.* 44:236-239.
- Grabau, L.J., Blevins, D.G. e Minor, H.C.** (1986). Stem infusions enhanced methionine content of soybean storage protein. *Plant Physiol.* 82:1013-1018.
- Hajika, M., Igita, K. e Kitamura, K.** (1991). A line lacking all the seed lipoxygenase isozymes in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) induced by gamma-ray irradiation. *Japan. J. Breed.* 41:507-509.
- Hajika, M., Kitamura, K., Igita, K. e Nakazawa, Y.** (1992). Genetic relationships among the genes for lipoxygenase-1, -2 and -3 isozymes in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seed. *Japan J. Breed.* 42:787-792.
- Hammond, E.G., Duvick, D.N., Fehr, W.R., Hildebrand, D.F., Lacefield, E.C. e Pfeiffer, T.W.** (1992). Rapid screening techniques for lipoxygenases in soybean seeds. *Crop Sci.* 32:820-821.
- Hildebrand, D.F. e Hymowitz, T.** (1981). Two soybean genotypes lacking lipoxygenase-1. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 49:33-35.
- Hill, J.E. e Breidenbach, R.W.** (1974). Proteins of soybean seeds. *Plant Physiol.* 53:742-746.
- Instituto Adolfo Lutz.** (1985). *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* 3. ed., São Paulo. v.1, 533p.
- Iwabuchi, S. e Yamauchi, F.M.** (1987). Determination of glycinin and  $\beta$ -conglycinin in soybean proteins by immunological methods. *J. Agric. Food Chem.* 35:200-205.

- Kikuchi, A. e Kitamura, K.** (1987). Simple and rapid carotene bleaching tests for the detection of lipoxygenase isozymes in soybean seeds. *Japan. J. Breed.* 37:10-16.
- Kinsella, J.E.** (1979). Functional properties of soy proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56:242-258.
- Kitamura, K.** (1984). Biochemical characterization of lipoxygenase lacking mutants, L-1-less, L-2-less, and L-3-less soybeans. *Agric. Biol. Chem.* 48:2339-2346.
- Kitamura, K., Davies, C.S., Kaizuma, N. e Nielsen, N.C.** (1983). Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. *Crop Sci.* 23:924-927.
- Kitamura, K., Davies, C.S. e Nielsen, N.C.** (1984). Inheritance of alleles for Cgy1 and Gy4 storage protein genes in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 68: 253-257.
- Kitamura, K., Kumagai, A. e Kikuchi, A.** (1985). Inheritance of lipoxygenase-2 and genetic relationship among genes for lipoxygenase-1, -2 and -3 isozymes in soybean seeds. *Japan. J. Breed.* 35:413-420.
- Kohyama, K., Yoshida, M. e Nishinari, K.** (1992). Rheological study on gelation of soybean 11S protein by glucono- $\delta$ -lactone. *J. Agric. Food Chem.* 40:740-744.
- Kohyama, K., Murata, M., Tani, F., Sano, Y. e Doi, E.** (1995). Effects of protein composition on gelation of mixtures containing soybean 7S and 11S globulins. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:240-245.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Mathews, C.K. e Holde, K.E.** (1990). *Biochemistry*. The Benjamin/Cummings Publ. Co. 1257p.
- Moreira, M.A., Hermodson, M.A., Larkins, B.A. e Nielsen, N.C.** (1979). Partial characterization of the acidic and basic poly peptides of glycinin. *J. Biol. Chem.* 254:9921-9926.
- Moreira M.A., Hermodson, M.A., Larkins, B.A. e Nielsen, N.C.** (1981). Comparison of the primary structure of the acidic polypeptides of glycinin. *Arch. Biochem. Biophys.* 210:636-642.
- Moreira, M.A., Tavares, S.R., Ramos, V. e Barros, E.G.** (1993). Hexanal production and TBA number are reduced in soybean

- [*Glycine max* (L.) Merr.] seeds lacking lipoxygenase isozymes 2 and 3. *J. Agric. Food Chem.* 41:103-106.
- Murphy, P.A. e Resurreccion, A.P.** (1984). Varietal and environmental differences in soybean glycinin and  $\beta$ -conglycinin content. *J. Agric. Food Chem.* 32:911-915.
- Nakamura, T., Utsumi, S. e Mori, T.** (1986). Mechanism of heat-induced gelation and gel properties of soybean 7S globulin. *Agric. Biol. Chem.* 50:1287-1293.
- Nielsen, N.C, Moreira, M.A., Staswick, P., Hermodson, M.A., Tumer, N. e Thanh, V.H.** (1981). The structure of glycinin from soybeans. *Abhdlg. Akad. Wiss. DDR* 5:73-91.
- O'Neill, T.E. e Kinsella, J.E.** (1987). Flavor protein interaction characterization of 2-nonanone binding to isolated soy protein fractions. *J. Food Sci.* 52:98-101.
- Rackis, J.J., Sessa, D.J. e Honig, D.H.** (1979). Flavor problems of vegetable food proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56:262-271.
- Samoto, M., Miyazaki, C., Akasaka, T., Mori, H. e Kawamura, Y.** (1996). Specific binding of allergenic soybean protein *Gly m Bd*30K with  $\alpha'$ - and  $\alpha$ -subunits of conglycinin in soy milk. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60:1006-1010.
- Spackman, D.H., Stein, W.H. e Moore, S.** (1958). Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30:190-206.
- Staswick, P.E., Hermodson, M.A. e Nielsen, N.C.** (1981). Identification of the acidic and basic subunits complexes of glycinin. *J. Biol. Chem.* 256:8752-8755.
- Thanh, V.H. e Shibasaki, K.** (1977). Beta-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms. *Biochim. Biophys. Acta* 490:370-384.
- Visentainer, J.V., Laguila, J.E., Matsushita, M. e Souza, N.E.** (1991). Composição de ácidos graxos em diversas variedades de soja recomendadas para cultivo no Brasil. *Arq. Biol. Tecnol.* 34:1-6.
- Wolf, W.J.** (1975). Lipoxygenase and flavor of soybean protein products. *J. Agric. Food Chem.* 23:136-141.
- Yukawa, N., Takamura, H., Kitamura, K. e Matoba, T.** (1995). Proportion of hexanal to total carbonyl compounds in soybean extracts. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:723-724.

**Zarkadas, C.G., Yu, Z., Voldeng, H.D. e Amado, A.M. (1993).**  
Assessment of the protein quality of a new high-protein soybean  
cultivar by amino acid analysis. *J. Agric. Food Chem.* 41:616-623.

# UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RAPD-PCR NA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE SOJA PARA ALIMENTAÇÃO HUMANA EM POPULAÇÕES SEGREGANTES

## ABSTRACT

In this work, genetic distances were estimated between  $F_2$  and  $F_3$  individuals, selected for the absence of lipoxygenases,  $\alpha'$  and G4 derived from crosses between PBTN (a line lacking LOX $\alpha_1$ , 2 and 3 and G4 glycinin subunit) x [Keburi (a line lacking the  $\beta$ -conglycinin subunit  $\alpha'$ ) x UFV91.751 (a line lacking LOX $\alpha_2$  and 3)], and the line PB $\alpha_2,3$ . PB $\alpha_2,3$  is one of the lines that have been used as recurrent parent in our breeding program for the improvement of soybean seed quality for human consumption. Twelve phenotypic characters and 29 RAPD loci were used to estimate the genetic distances. RAPD markers and phenotypic assisted selection could discriminate individuals genetically more similar to PB $\alpha_2,3$  line. Based on our data, we propose the use of RAPD markers to pre-select individuals in the vegetative stage and, thereafter, the use of phenotypic traits to further select the remainder individuals. As RAPD markers are not influenced by the environment the pre-selection will have the advantage of reducing the number of individuals in the population during the early developmental stages.

## RESUMO

Neste trabalho foram estimadas as distâncias genéticas em populações  $F_2$  e  $F_3$ , em relação à linhagem PB $\alpha_2,3$  (linhagem sem as lipoxigenases 2 e 3) a ser usada como progenitor recorrente. Estas populações são oriundas do cruzamento [‘PBTN’ x (‘UFV91.751’ x ‘Keburi’)]. Os progenitores não possuíam lipoxigenases (LOX) e subunidade G4 (‘PBTN’), ou LOX $\alpha_2$  e 3 (‘UFV91.751’) ou a subunidade  $\alpha'$  (‘Keburi’). As populações foram selecionadas para ausência de LOX e

das subunidades protéicas  $\alpha'$  e G4, por meio de métodos colorimétricos e eletroforese em gel de poliacrilamida. Nas estimativas das distâncias genéticas foram utilizadas 12 características fenotípicas e 29 loci RAPD identificados pela técnica de RAPD-PCR, sendo utilizados, na população  $F_2$ , somente marcadores RAPD. Para os cálculos de distâncias genéticas estimadas por meio de dados fenotípicos, utilizou-se a distância euclidiana média com dados transformados e, para os dados obtidos com marcadores RAPD, a distância calculada pelo complemento da coincidência simples. Ambos os tipos de seleção discriminaram indivíduos geneticamente mais próximos da linhagem PB2,3, porém com baixo grau de coincidência, dependendo da pressão de seleção utilizada. Baseado nesses resultados, sugere-se a utilização conjunta de distâncias genéticas estimadas por meio de marcadores RAPD e de dados fenotípicos numa população, na qual seria realizada uma pré-seleção durante o período vegetativo das plantas, por meio das distâncias genéticas estimadas com marcadores RAPD. As plantas pré-selecionadas seriam avaliadas, posteriormente, por meio de características fenotípicas. Considerando-se que marcadores RAPD não sofrem influência do ambiente, a pré-seleção apresenta a vantagem de diminuir a população a ser conduzida.

## INTRODUÇÃO

No Brasil, a soja é utilizada, principalmente, para produção de óleo e derivados que são amplamente aceitos pelo consumidor; já o farelo é usado em rações de animais domésticos, apesar de seu alto conteúdo protéico (Panizzi, 1987). O maior obstáculo para o consumo da proteína da soja nos países ocidentais é o sabor característico, denominado “beany flavor”, presente nos produtos derivados (Rackis *et al.*, 1979). O “beany flavor” origina-se da associação de compostos carbonílicos de cadeia curta com a fração protéica. Estes compostos orgânicos são produtos finais de uma série de reações que se inicia com

a hidroxidação de ácidos graxos poliinsaturados, catalisada pelas lipoxigenases (EC 1.13.11.12) (Axelrod, 1974).

Lipoxigenases são dioxigenases, cujas três formas isoenzimáticas (LOX 1, 2 e 3) ocorrem nas sementes da maioria dos cultivares comerciais de soja. A presença de cada isoenzima é codificada por um único gene dominante, com herança mendeliana (Siedow, 1991). A eliminação genética dessas enzimas tem sido sugerida como o método mais eficiente para melhorar o sabor de produtos derivados da soja (Kitamura *et al.*, 1983). Existem mutantes naturais com ausência de cada isoenzima (Hildebrand e Hymowitz, 1981; Kitamura *et al.*, 1983; Kitamura, 1984), tendo sido obtidos duplos mutantes por meio de cruzamentos genéticos (Kitamura *et al.*, 1985; Moreira *et al.*, 1993). Não foi possível obter o triplo-nulo ou a ausência simultânea de LOX 1 e 2 por meio de cruzamentos, porque existe estreita ligação entre os genes que codificam essas isoenzimas. O triplo-nulo somente foi obtido mediante mutação induzida por radiação  $\gamma$  (Hajika *et al.*, 1991).

Sementes de soja apresentam 40% de proteína total, com base na matéria seca, e as proteínas de reserva,  $\beta$ -conglucina (7S) e glicina (11S), representam cerca de 70% da proteína total (Hill e Breidenbach, 1974). Os polipeptídeos constituintes da glicina e  $\beta$ -conglucina diferem em seus conteúdos de metionina (Moreira *et al.*, 1979, 1981; Coates *et al.*, 1985).

A  $\beta$ -conglucina é uma glicoproteína com massa molecular estimada em 150-170 kDa e possui três subunidades denominadas  $\alpha$ ,  $\alpha'$  e  $\beta$  (Thanh e Shibasaki, 1977). As subunidades  $\alpha$  e  $\alpha'$  possuem dois e três resíduos de metionina, respectivamente, e a subunidade  $\beta$  não possui este aminoácido (Coates *et al.*, 1985). Existe polimorfismo genético na constituição de moléculas de  $\beta$ -conglucina, tendo sido encontrado genótipo com ausência de  $\alpha'$  (Kitamura *et al.*, 1984).

A glicinina apresenta massa molecular de aproximadamente 350 KDa, sendo constituída por polipeptídeos de caráter ácido e de caráter básico. Foram isolados da glicinina seis polipeptídeos ácidos (A1a, A1b, A2, A3, A4 e A5) e cinco básicos (B1a, B1b, B2, B3 e B4), associados aos pares por uma ligação bissulfídrica entre um polipeptídeo ácido e um polipeptídeo básico formando as subunidades intermediárias A1aB2, A1bB1b, A2B1a, A5A4B3 e A3B4 (Moreira *et al.*, 1979, 1981). Os polipeptídeos A1a, A1b, A2, B1 e B2 possuem de três a seis vezes mais metionina que A3, A4, A5, B3 e B4 (Moreira *et al.*, 1979).

Atualmente, as subunidades são denominadas G1 (A1aB2), G2 (A2B1a), G3 (A1bB1b), G4 (A5A4B3) e G5 (A3B4) e seus genes Gy1, Gy2, Gy3, Gy4 e Gy5, respectivamente (Cho *et al.*, 1989)

Em glicinina também têm sido observadas variações na composição polipeptídica da proteína, evidenciadas pela existência de mutantes naturais, como ausência do complexo G4 (Fontes e Moreira, 1984).

No Programa de Melhoramento de Soja para Consumo Humano, da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil, está sendo introduzida a ausência de LOX e de subunidades protéicas em variedades comerciais brasileiras, por meio de retrocruzamentos.

O retrocruzamento permite a transferência de um ou mais genes de interesse de um progenitor não-recorrente (doador) para um progenitor recorrente (receptor) que não possui as características condicionadas por esses genes. Normalmente, o progenitor recorrente é um genótipo adaptado, superior em vários aspectos, mas que não possui os poucos genes de interesse do não-recorrente (Allard, 1971). Com pelo menos seis retrocruzamentos, acompanhados de rígida seleção nas primeiras gerações, permite-se recuperar a maioria das características do progenitor recorrente. A cada retrocruzamento, a progênie assemelha-se, na proporção de 0,5 a mais, ao progenitor recorrente.

A utilização de marcadores moleculares no monitoramento de retrocruzamentos permite que maior número de características do progenitor recorrente seja recuperado em menor período de tempo, pois possibilita a seleção, na população segregante, de indivíduos que mais

se assemelham ao progenitor recorrente (Tanksley *et al.*, 1989). Isso é, particularmente, útil no melhoramento da cultura da soja, que apresenta base genética estreita (Hiromoto e Vello, 1986; Abdelnoor *et al.*, 1995).

Nesse trabalho foi utilizada a técnica de RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) para selecionar indivíduos geneticamente mais próximos do progenitor recorrente em populações segregantes com ausência de LOX,  $\alpha'$  e G4, visando acelerar a recuperação dos caracteres agronômicos desejáveis.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Materiais Genéticos e Cruzamentos:** Foram utilizados os seguintes genótipos: Keburi, UFV91.751, PBTN, PB2,3 e KCP (populações F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub>). A variedade Keburi não apresenta a subunidade protéica  $\alpha'$ , da glicinina; UFV91.751 é uma linhagem com ausência de LOX2 e 3 e heterogênea para presença da subunidade G4; e a linhagem PBTN não possui LOX1, 2 e 3 e a subunidade protéica G4 nas sementes. A linhagem PB 2,3 não apresenta LOX2 e 3 e tem sido utilizada como progenitor recorrente em retrocruzamentos, visando melhorar a qualidade de sementes de soja para consumo humano.

A população KCPF<sub>2</sub> foi originada do cruzamento ['PBTN' x ('UFV91.751' x 'Keburi')], com seleção para ausência de LOX e das subunidades protéicas  $\alpha'$  e G4. As populações F<sub>3</sub> foram originadas de autofecundação de plantas F<sub>2</sub> selecionadas. Os indivíduos KCP não possuem LOX,  $\alpha'$  e G4, pela seleção por meio de métodos bioquímicos colorimétricos não destrutivos (Hammond *et al.*, 1992) e eletroforese SDS-PAGE (Laemmli, 1970). A variedade Keburi apresenta ausência do polipeptídeo  $\alpha'$ , componente da proteína de reserva  $\beta$ -conglucina (Kitamura *et al.*, 1984). A linhagem UFV91.751 apresenta ausência de LOX2 e 3 e é derivada de cruzamentos entre 'Cristalina', 'PI86023' e 'Ichigowase', seguidos de três gerações de retrocruzamentos e vários ciclos de seleção. A linhagem PBTN é derivada de cruzamentos entre a

variedade Paranaíba com linhagens PB<sub>2,3</sub> (Paranaíba sem LOX<sub>2</sub> e 3) e linhagens triplo-nulas. Foram utilizadas 40 plantas F<sub>2</sub> e 52 plantas F<sub>3</sub>. As plantas F<sub>3</sub> foram obtidas de sementes de oito plantas F<sub>2</sub>, sendo quatro geneticamente mais próximas do progenitor recorrente e quatro mais distantes, estimadas por meio de marcadores RAPD.

**Avaliações Fenotípicas:** Foram feitas avaliações dos seguintes caracteres agronômicos nas plantas F<sub>3</sub> e nos progenitores em casa de vegetação: dias para floração e maturação, número de nós e altura da planta no florescimento; altura da planta, produção de sementes, número de sementes, número de vagens, peso médio de 100 sementes, número de sementes por vagem; inserção da primeira vagem e pilosidade da vagem (utilizou-se uma escala de 0 a 3, na qual 0 foi ausência de pêlos e 3, presença de pêlos, como na variedade Paranaíba), na colheita.

**Extração de DNA:** Foram utilizadas folhas totalmente expandidas das plantas F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub>, que foram armazenadas a - 80 °C até o momento da extração de DNA (Doyle e Doyle, 1990).

**Amplificação de DNA.** Cada reação de 25 µl continha: 30 ng de DNA; 100 µM de cada deoxiribonucleosídeo trifosfatado; 2,8 mM de MgCl<sub>2</sub>; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM de KCl; 0,4 µM de “primer” decâmero (Operon Technologies, Alameda, CA, USA) e uma unidade de *Taq* DNA polimerase. A amplificação foi realizada em termociclador, modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus Corp., Norwalk, Conn., USA) programado para 40 ciclos. Cada ciclo consistiu de desnaturação a 94°C por 15 segundos, pareamento a 35°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Após o 40º ciclo, utilizou-se passo adicional de 72°C durante 7 minutos. Os produtos de amplificação foram separados em géis de agarose 1,2% imersos em tampão TBE (90 mM de Tris-borato, 1 mM de EDTA pH 8,0), contendo 0,2 µg/ml de brometo de

etídio. Após corrida a 100V durante 4 horas, as bandas de DNA foram visualizadas sob luz UV, sendo a imagem fotodocumentada em sistema EAGLE EYE II (Stratagene). Os “primers” decâmeros utilizados neste trabalho foram adquiridos da Operon Technologies (Alameda, CA, USA) e estão relacionados na Tabela 1, juntamente com as respectivas seqüências de bases.

**Análises Estatísticas:** As bandas de DNA mais proeminentes foram avaliadas como 1 (presente) ou 0 (ausente), sendo utilizadas para determinar a dissimilaridade genética. As distâncias genéticas foram determinadas por meio da divisão do número de bandas polimórficas entre dois genótipos pelo número total de produtos de amplificação, sendo também denominada complemento da coincidência simples ou distância comum.

Tabela 1 - Listagem dos “primers” decâmeros utilizados e suas seqüências

“Primer”	Seqüência (5'- 3')	“Primer”	Seqüência (5'- 3')
OPA04	AATCGGGCTG	OPH04	GGAAGTCGCC
OPA07	GAAACGGGTG	OPI01	ACCTGGACAC
OPB01	GTTTCGCTCC	OPI04	CCGCCTAGTC
OPC08	TGGACCGGTG	OPK03	CCAGCTTAGG
OPC18	TGAGTGGGTG	OPM02	ACAACGCCTC
OPF04	GGTGATCAGG	OPM04	GGCGGTTGTC
OPG02	GGCACTGAGG	OPX01	CTGGGCACGA

$$\text{Distância comum} = 1 - \left( \frac{a+d}{a+b+c+d} \right)$$

em que a = número de ocorrências (1,1); b = número de ocorrências (1,0); c = número de ocorrências (0,1); e d = número de ocorrências (0,0).

A dissimilaridade genética baseada nos caracteres fenotípicos foi estimada pela distância euclidiana média, com dados transformados por meio da divisão pelo desvio-padrão.

$$\text{Distância Euclidiana Média Transformada} = d_{ij}' = \sqrt{\frac{1}{n} \sum (x_{ij} - x_{i'j})^2}$$

em que  $n$  = número de caracteres analisados; e  $x_{ij}$  = observação do  $i$ -ésimo progenitor em referência ao  $j$ -ésimo caráter, dividido pelo desvio-padrão do  $j$ -ésimo caráter.

As distâncias genéticas, baseadas em dados gerados por marcadores RAPD-PCR e em características fenotípicas foram analisadas, utilizando-se o programa Genes v. 96.1, desenvolvido pelo Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 88 produtos de amplificação com os 14 “primers” polimórficos utilizados, com média de 6,3 bandas de DNA por “primer”, sendo 29 bandas polimórficas (Tabela 2) e 59 bandas monomórficas. Estes números estão na faixa de valores obtidos para soja por outros autores (Tingey *et al.*, 1992; Vilarinhos *et al.*, 1994; Abdelnoor *et al.*, 1995).

Na Figura 1 são apresentados produtos de amplificação obtidos com genótipos de soja, utilizando o “primer” OPC18, podendo-se discriminar bandas monomórficas e uma polimórfica de 750 pares de nucleotídeos.

A dissimilaridade genética entre os progenitores utilizados, estimada com dados binários gerados por RAPD, variou de 0,15 a 0,24, ocorrendo a maior distância entre ‘PBTN’ e ‘UFV91.751’ e a menor, entre ‘UFV91.751’ e ‘PB 2,3’ (Tabela 3).

Os caracteres fenotípicos avaliados encontram-se na Tabela 4, onde se evidencia que a linhagem PB 2,3 apresentou caracteres agronomicamente desejáveis, como maior produção de sementes e dias para floração e maturação e adequadas altura de planta, inserção de primeira vagem e pilosidade. Vários destes caracteres estão alta e positivamente correlacionados, como altura de planta na maturação x

altura da planta no florescimento, número de vagens x número de sementes, dias para florescimento x altura da planta (no florescimento e na maturação) e produção x número de nós. Observa-se, também, que o número de sementes por vagem teve, de modo geral, correlação alta e negativa com as outras características fenotípicas avaliadas (Tabela 5).

Tabela 2 - Distribuição da bandas polimórficas entre os progenitores do cruzamento ['PBTN' x ('UFV 91.751' x 'Keburi')] e o progenitor recorrente 'PB 2,3'

Primer	Banda <sup>1/</sup>	UFV 91.751	Keburi	PBTN	PB 2,3
OPA04	a	1 <sup>2/</sup>	0 <sup>3/</sup>	0	0
OPA04	b	1	0	0	1
OPA04	c	1	0	1	1
OPA04	d	0	1	1	0
OPA07	a	0	1	1	0
OPA07	b	1	1	1	0
OPA07	c	0	1	0	0
OPB01	a	0	0	1	1
OPB01	b	1	1	0	1
OPB01	c	1	1	0	0
OPC08	a	1	1	1	0
OPC08	b	1	1	0	0
OPC18	a	1	1	0	0
OPF04	a	0	0	1	0
OPG02	a	0	0	1	0
OPG02	b	1	1	0	1
OPH04	a	1	0	0	0
OPI01	a	0	0	1	0
OPI01	b	0	1	0	0
OPI04	a	0	0	1	0
OPI04	b	1	0	0	0
OPI04	c	0	1	1	0
OPI04	d	0	0	1	0
OPK03	a	0	1	0	1
OPK03	b	0	1	1	1
OPM04	a	1	1	0	0
OPX01	a	0	1	0	0
OPX01	b	1	0	1	1
OPX01	c	0	0	1	1

<sup>1/</sup>: Um mesmo "primer" amplificou até quatro bandas polimórficas (a, b, c, d).

<sup>2/</sup> (1) indica presença da banda.

<sup>3/</sup> (0) indica ausência da banda.

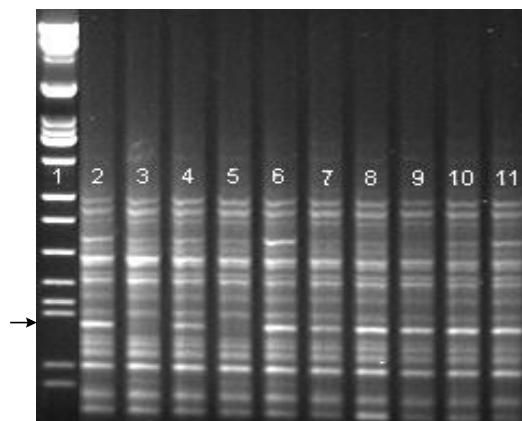


Figura 1 - Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de genótipos de soja pela técnica de RAPD-PCR com o “primer” OPC18. 2-UFV91.751, 3-PBTN, 4-Keburi, 5-PB 2,3, e 6 a 11-indivíduos F<sub>2</sub> do cruzamento [‘PBTN’ x (‘UFV91.751’ x ‘Keburi’)]; a coluna 1 corresponde ao DNA do fago λ digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII* (marcadores de tamanho dos fragmentos de DNA); a seta indica a banda polimórfica de 750 pares de nucleotídeos.

As distâncias genéticas estimadas com base nas 12 características fenotípicas, calculadas pelo método euclidiano médio com dados transformados, variaram de 0,91 a 2,11. Verificou-se a maior distância entre os genótipos Keburi e PB 2,3 e, a menor, entre UFV91.751 e PBTN (Tabela 6).

Tabela 3 - Matriz de dissimilaridade (%) entre os progenitores do cruzamento [‘PBTN’ x (‘UFV91.751’ x ‘Keburi’)] e ‘PB 2,3’, baseada em marcadores RAPD (distâncias estimadas pelo complemento da coincidência simples)

	UFV 91.751	Keburi	PBTN	PB 2,3
UFV 91.751	0			
Keburi	0,16	0		
PBTN	0,24	0,22	0	

PB 2,3                      0,15                      0,19                      0,16                      0

**Tabela 4 - Caracteres fenotípicos utilizados para estimar distâncias genéticas entre os genótipos UFV 91.751, Keburi, PBTN e PB 2,3**

Caracteres	UFV 91.751	Keburi	PBTN	PB 2,3	Média	C.V. (%)
Inserção da 1 <sup>a</sup> . vagem (cm)	4,9	3,8	6,4	5,2	5,0	21,4
Altura da planta (cm)	67,6	57,1	55,6	112,6	73,2	36,5
Número de vagens/planta	79,0	20	46	99	61,2	57,3
Número de sementes/planta	163,0	46	97	182	122,0	51,2
Produção/planta (g)	29,3	10,2	23,4	35,7	24,7	44,2
Altura no florescimento (cm)	51,0	41,0	44,0	86,0	55,5	37,5
Número de nós no florescimento	12,8	9,0	11,8	15,4	12,2	21,6
Sementes/vagem	2,1	2,4	2,1	1,8	2,1	11,5
Peso de 100 sementes (g)	17,9	22,4	24,9	19,6	21,2	14,6
Dias para floração	39,5	28,25	35,0	50,0	38,2	23,9
Dias para maturação	98,0	95,0	102,0	115,0	102,5	8,8
Pilosidade da vagem	2,4	1,0	2,8	2,3	2,1	37,4

**Tabela 5 - Correlação entre os caracteres fenotípicos utilizados para estimar distâncias genéticas entre os genótipos UFV 91.751, Keburi, PBTN e PB 2,3**

Caracteres	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Inserção da 1 <sup>a</sup> . vagem	A	1,00										
Altura da planta	B	0,04	1,00									
Número de vagens	C	0,30	0,83	1,00								
Número de sementes/planta	D	0,32	0,76	0,99	1,00							
Produção de sementes/planta	E	0,50	0,76	0,98	0,97	1,00						
Altura no florescimento	F	0,12	1,00	0,85	0,78	0,80	1,00					
Número de nós no florescimento	G	0,45	0,85	0,97	0,95	0,98	0,89	1,00				
Sementes/vagem	H	-	-	-	-	-	-	-	1,00			
		0,53	0,85	0,92	0,89	0,96	0,88	0,99				
Peso de 100 sementes	I	0,37	-	-	-	-	-	-	0,38	1,00		
			0,53	0,70	0,73	0,56	0,50	0,52				

Dias para floração	J	0,33	0,91	0,98	0,95	0,96	0,93	0,99	-	-	1,00		
									0,97	0,58			
Dias para maturação	K	0,40	0,91	0,77	0,70	0,79	0,94	0,88	-	-	0,89	1,00	
									0,93	0,21			
Pilosidade da vagem	L	0,94	0,15	0,54	0,58	0,70	0,23	0,62	-	0,04	0,51	0,42	1,00
									0,65				

Tabela 6 - Matriz de dissimilaridade entre os progenitores do cruzamento ['PBTN' x ('UFV 91.751' x 'Keburi')] e 'PB 2,3', baseada em características fenotípicas (distância euclidiana média com dados transformados)

	UFV 91.751	Keburi	PBTN	PB 2,3
UFV 91.751	0			
Keburi	1,25	0		
PBTN	0,91	1,27	0	
PB 2,3	1,10	2,11	1,53	0

Observando os dendrogramas na Figura 2, verifica-se que a linhagens UFV 91.751 e PBTN apresentaram as menores distâncias genéticas com base em caracteres fenotípicos (2A), enquanto com marcadores RAPD ocorre o inverso (2B).

A correlação entre as distâncias genéticas estimadas pelos dois métodos foi baixa (-0,164), indicando não estarem os loci avaliados por marcadores RAPD relacionados com os caracteres fenotípicos avaliados. Salienta-se que os caracteres fenotípicos avaliados são influenciados pelo ambiente (caracteres quantitativos).

Em razão de se ter observado baixa correlação entre as distâncias genéticas estimadas com dados fenotípicos e marcadores RAPD entre os genótipos UFV 91.751, Keburi, PBTN e PB 2,3, especulou-se qual ou quais características fenotípicas seriam responsáveis pela baixa correlação entre os dois métodos utilizados.

Para isso, correlacionaram-se as distâncias genéticas obtidas com cada característica fenotípica isoladamente, com todas as características fenotípicas e com marcadores RAPD. O Quadro 5 evidencia que houve correlação positiva das distâncias genéticas

baseadas em altura de inserção da primeira vagem, peso médio de 100 sementes e pilosidade da vagem com as distâncias genéticas baseadas em marcadores RAPD; porém, somente com as distâncias baseadas em dados de altura de inserção da primeira vagem, essa correlação foi superior a 0,5.

As correlações entre distâncias genéticas estimadas com caracteres fenotípicos que apresentaram correlação alta e positiva entre si, também, foram altas e positivas (Tabelas 5 e 7).

Foram utilizadas para o cálculo das distâncias genéticas baseadas em características fenotípicas a distância euclidiana média, para contornar a influência do número de caracteres, e dados padronizados por meio da divisão pelo desvio-padrão, para diminuir a distorção provocada pelas diferentes escalas de medições (Cruz e Regazzi, 1994). O complemento da coincidência simples foi escolhido porque não utiliza o dobro de  $a$  (1,1), como no método de Dice (1945), também conhecido como Nei, Nei e Li ou Lance e Williams, que pode superestimar as distâncias genéticas.

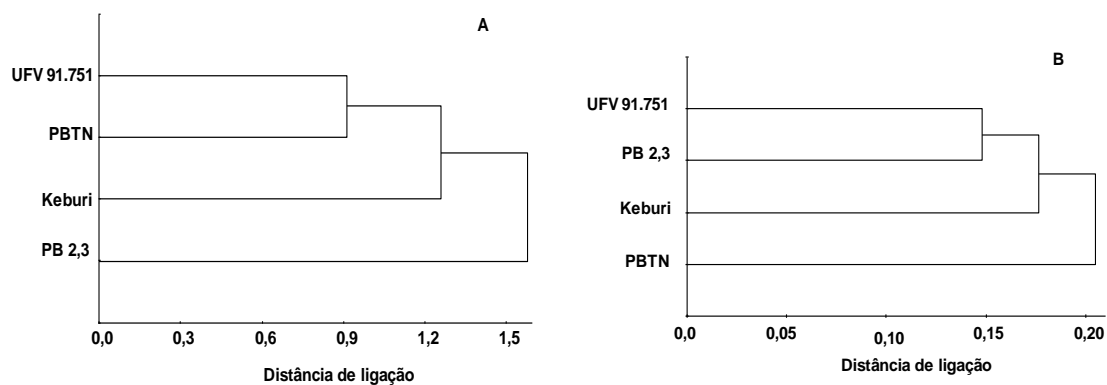


Figura 2 - Dendrogramas de distâncias relativas entre os progenitores do cruzamento ['PBTN' x ('UFV 91.751' x 'Keburi')] e 'PB 2,3', baseado em características fenotípicas(A) e marcadores RAPD (B); distâncias genéticas baseadas em marcadores RAPD, como distância simples, e em caracteres fenotípicos, pela distância euclidiana média com dados transformados; e método de aglomeração "UPGA".

Tabela 7 - Correlação das distâncias genéticas estimadas entre os genótipos UFV 91.751, Keburi, PBTN e PB 2,3, com cada característica fenotípica, com todas as características fenotípicas e com marcadores RAPD

Características		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Inserção da 1ª. vagem (cm)	A	1,00													
Altura da planta (cm)	B	-0,56	1,00												
Número de vagens	C	-0,04	0,44	1,00											
Número de sementes	D	0,11	0,19	0,97	1,00										
Produção (g)	E	0,19	0,22	0,88	0,87	1,00									
Altura (cm) no florescimento	F	-0,54	0,99	0,47	0,23	0,29	1,00								
Número de nós no florescimento	G	-0,04	0,55	0,84	0,74	0,92	0,62	1,00							
Sementes/vagem	H	-0,04	0,55	0,65	0,51	0,82	0,63	0,96	1,00						
Peso de 100 sementes	I	0,08	-0,19	0,14	0,26	-0,23	-0,27	-0,40	-0,65	1,00					
Dias para floração	J	-0,23	0,75	0,86	0,71	0,80	0,80	0,95	0,88	-0,26	1,00				
Dias para maturação	K	-0,39	0,87	0,29	0,04	0,27	0,90	0,61	0,72	-0,57	0,71	1,00			
Pilosidade da vagem	L	0,78	-0,49	0,30	0,45	0,64	-0,42	0,39	0,38	-0,21	0,12	-0,29	1,00		
12 características fenotípicas	M	0,07	0,59	0,87	0,77	0,89	0,64	0,97	0,90	-0,26	0,95	0,62	0,37	1,00	
Marcadores RAPD	N	0,71	-0,53	-0,15	0,00	-0,12	-0,55	-0,33	-0,39	0,39	-0,40	-0,38	0,30	-0,17	1,00

A distância genética estimada entre os progenitores possibilitou a detecção de variação entre os indivíduos F<sub>2</sub> do cruzamento ['PBTN' x ('UFV 91.751' x 'Keburi')], cuja avaliação foi feita com dados gerados por RAPD. As distâncias genéticas calculadas em relação à linhagem PB 2,3 variaram de 0,14 a 0,25 (Tabela 8). As distâncias estimadas, entre 0,01 e 0,22, indicaram baixa variabilidade genotípica entre os

indivíduos  $F_2$ , fato já detectado entre os progenitores utilizados (Figura 2 e Tabela 8).

Foram selecionadas oito plantas  $F_2$  (quatro mais próximas e quatro mais distantes de PB 2,3) com base nas distâncias genéticas estimadas com marcadores RAPD. As quatro mais próximas da linhagem PB 2,3 foram as plantas A621 e A622, que apresentaram 0,14 de dissimilaridade, e A141 e B141, com 0,16; enquanto as quatro mais distantes foram A321, A342, A561 e A803, que apresentaram 0,22 de distância genética (Tabela 8) para constituírem as famílias  $F_3$ . Cada família  $F_3$ , composta de cinco a 12 plantas foi analisada por meio de caracteres fenotípicos e marcadores RAPD.

Foi possível verificar dissimilaridade genética, utilizando-se características fenotípicas e marcadores RAPD, entre a linhagem PB 2,3 e indivíduos  $F_3$ , além de dissimilaridade dentro das famílias e entre famílias, visto que ocorreu segregação entre os indivíduos (Tabelas 9 e 10).

As distâncias genéticas estimadas dos indivíduos KCP  $F_3$  em relação à linhagem PB 2,3 variaram de 1,8 a 3,9, por meio das características fenotípicas (Tabela 9), enquanto, com a utilização de marcadores RAPD, variaram de 0,14 e 0,26 (Tabela 10).

De modo geral, mantiveram-se as distâncias, isto é, plantas  $F_2$  mais similares à linhagem PB 2,3 geraram indivíduos  $F_3$  mais similares a essa mesma linhagem (Tabelas 8 e 10), pois as quatro famílias mais próximas tiveram distância genética média de  $0,18 \pm 0,02$ , enquanto as quatro mais distantes apresentaram distância genética média de  $0,22 \pm 0,02$  (Tabela 11).







Tabela 11 - Distâncias genéticas entre indivíduos F<sub>3</sub> do cruzamento ['PBTN' x ('UFV91.751' x 'Keburi')] e 'PB2,3', baseadas em dados fenotípicos (distância euclidiana média) e marcadores RAPD (distância comum)

Família	Indivíduo	Dist. euclidiana	Dist. Comum	Família	Indivíduo	Dist. euclidiana	Dist. comum	
A621	1	3,0	0,17	A321	1	3,6	0,22	
	2	3,2	0,17		2	3,4	0,22	
	3	3,3	0,16		3	3,3	0,21	
	4	3,1	0,21		4	2,8	0,22	
	5	3,4	0,19		5	3,3	0,23	
	6	3,2	0,17		6	3,9	0,22	
	7	3,2	0,19		Média ± DP	3,4 ± 0,4	0,21 ± 0,02	
	8	3,2	0,19		C.V.(%)	10,6	3,3	
	9	3,0	0,17		r	-0,1		
	10	3,0	0,16		A342	1	3,2	0,23
	11	3,2	0,21			2	3,2	0,21
	12	3,2	0,20			3	3,3	0,21
Média ± DP	3,2 ± 0,12	0,18 ± 0,02	4	2,9		0,21		
C.V. (%)	3,7	8,6	5	3,1		0,23		
r	0,13		6	2,8		0,17		
A622	1	3,7	0,17	Média ± DP	3,1 ± 0,2	0,21 ± 0,02		
	2	3,8	0,16	C.V.(%)	6,3	10,10		
	3	3,6	0,19	r	0,6			
	4	3,6	0,21	A561	1	3,4	0,21	
	5	3,7	0,20		2	3,1	0,21	
	6	3,5	0,14		3	3,1	0,21	
Média ± DP	3,6 ± 0,11	0,18 ± 0,02	4		2,9	0,17		
C.V. (%)	3,00	14,09	5		2,8	0,21		
r	0,010		6		2,6	0,22		
A141	1	2,3	0,16	Média ± DP	3,0 ± 0,27	0,21 ± 0,02		
	3	2,9	0,20	C.V.(%)	8,86	7,73		
	4	2,0	0,17	r	-0,051			
	5	1,8	0,20	A803	1	2,7	0,26	
	6	2,4	0,16		2	2,8	0,19	
	Média ± DP	2,27 ± 0,41	0,18 ± 0,02		3	3,0	0,21	
C.V.(%)	18,18	9,85	4		2,4	0,26		
r	0,068		5		2,6	0,22		
			6		2,4	0,23		
B141	1	2,5	0,15	Média ± DP	2,64 ± 0,25	0,23 ± 0,03		
	2	2,4	0,19	C.V.(%)	9,55	12,027		
	3	3,0	0,17	r	-0,51			
	4	2,7	0,17	Média geral ± DP	3,0 ± 0,47	0,20 ± 0,03		
	5	2,1	0,15		C.V.(%)	15,57	13,63	
Média ± DP	2,5 ± 0,3	0,17 ± 0,02	r		0,06			
C.V.(%)	13,4	9,32						
r	0,4							

As distâncias genéticas entre os indivíduos  $F_3$  e PB 2,3, obtidas por caracteres fenotípicos e marcadores RAPD, tiveram correlação baixa (0,06), como verificado entre os progenitores desses indivíduos e 'PB 2,3'. Esta baixa correlação entre as duas estimativas de distâncias genéticas deveu-se à baixa correlação observada das distâncias genéticas entre os genótipos UFV 91.751, Keburi, PBTN e PB 2,3, baseadas em cada característica fenotípica, com a distância baseada em marcadores RAPD, como evidenciado na Tabela 7.

Apesar da baixa correlação entre as distâncias genéticas estimadas com dados fenotípicos e marcadores RAPD, ambas prestam-se a selecionar indivíduos das famílias  $F_3$ , oriundas do cruzamento [PBTN x (UFV 91.751 x Keburi)], mais próximos da linhagem PB 2,3.

Para essa seleção foram utilizados valores de distância genética-limite ou distância máxima, abaixo dos quais o indivíduo seria selecionado. Estes valores foram computados como o menor valor de distância genética, em cada tipo de estimativa da dissimilaridade genética, acrescido de um percentual (10%, 25% e 50%) da amplitude de variação das distâncias. Nota-se, na Tabela 12, que em todas as distâncias-limite é selecionado praticamente o mesmo número de indivíduos; no entanto, verificou-se que ocorre seleção de indivíduos distintos em cada método de seleção. Utilizando-se 10% da amplitude de variação, são selecionados cinco indivíduos mais similares à linhagem PB 2,3, mas nenhum simultaneamente pelos dois métodos. Já, com 25% da amplitude de variação, são selecionados 24 indivíduos, sendo três, simultaneamente, por caracteres fenotípicos e marcadores RAPD (Tabela 12). E, utilizando-se 50% da amplitude de variação, são selecionados 34 indivíduos mais similares à linhagem PB 2,3, entre os quais 15, simultaneamente, pelos dois tipos de seleção (Tabela 12).

Por meio da técnica de RAPD obtiveram-se polimorfismos entre os indivíduos analisados, permitindo a separação destes com o propósito de seleção daqueles geneticamente mais próximos da linhagem PB 2,3, mostrando ser uma técnica sensível para avaliar dissimilaridade genética entre genótipos de soja. Também foi possível

discriminar indivíduos geneticamente mais próximos da linhagem PB 2,3 utilizando dados fenotípicos.

Tabela 12 - Seleção de indivíduos F<sub>3</sub> do cruzamento ['PBTN' x ('UFV-91.751' x 'Keburi')], mais próximos de 'PB-2,3', baseada em dados fenotípicos (distância euclidiana média) e marcadores RAPD (complemento da coincidência simples)

Método de seleção	Distância máxima	Indivíduos	Indivíduos coincidentes
..... 10% da Amplitude de variação .....			
Fenotípico	2,03	A141-4 e 5	Nenhum
Marcador RAPD	0,15	A622-6 B141-1 e 5	
..... 25% da Amplitude de variação .....			
Fenotípico	2,75	A141-1, 4, 5 e 6 B141-1, 2, 4 e 5 A561-6 A803-1, 4, 5 e 6 A621-1,2,3,6,9	A141-1, 4 e 6
Marcador RAPD	0,17	A622-1, 2 e 6 A141-1, 4 e 6 B141-5 A342-6 A561-4	
..... 50% da Amplitude de variação .....			
Fenotípico	3,01	A621-1, 9 e 10 A141-1, 3, 4, 5 e 6 B141-1, 2, 3, 4 e 5 A321-4 A342-4 e 6 A561-4, 5 e 6 A803-1, 2, 3, 4 e 5	A621-1,9 e 10 A141-1,3, 4, 5 e 6 B141-1, 2, 3, 4 e 5 A342-6 A803-2
Marcador RAPD	0,1958	A621-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 A622-1,2 e 3 A141-1, 3,4, 5 e 6 B141-1, 2, 3, 4 e 5 A342-6 A803-2	

No entanto, dada à baixa correlação verificada entre os dois tipos de medida, não há coincidência total entre a seleção pelos dois métodos. Uma das possibilidades de utilização das distâncias genéticas baseadas em dados fenotípicos e marcadores RAPD seria fazer uma pré-seleção com marcadores RAPD, com as plantas ainda nos estádios vegetativos, eliminando-se parte da população, pois para a utilização de marcadores RAPD não é necessário que a planta complete seu ciclo de vida. As plantas pré-selecionadas por este método continuariam sendo avaliadas por caracteres fenotípicos até a colheita. A pré-seleção com marcadores RAPD diminui a população a ser conduzida, além de propiciar mais uma ferramenta de seleção no melhoramento, tendo em vista que esses marcadores não sofrem influência do ambiente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelnoor, R.V., Barros, E.G. e Moreira, M.A.** (1995). Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree data. *Brazil. J. Genet.* 18:265-273.
- Allard, R.W.** (1971). *Princípios de melhoramento genético das plantas*. Rio de Janeiro, USAID, 218p.
- Axelrod, B.** (1974). Lipoxygenases. *ACS Adv. Chem. Ser.* 136:324-348.
- Cho, T.J., Davies, C.S., Nielsen, N.C.** (1989). Inheritance and organization of glycinin genes in soybean. *Plant Cell.* 1:329-337.
- Coates, J.B., Medeiros, J.S., Thanh, V.H. e Nielsen, N.C.** (1985). Characterization of the subunits of  $\beta$ -conglitin. *Arch. Biochem. Biophys.* 243:184-194.
- Cruz, C.D., Regazzi, A.J.** (1994). *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa. UFV-Imprensa Universitária, 390p.
- Dice, L. R.** (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26:297-302.

- Doyle, J.J. e Doyle, J.L.** (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Fontes, E.P.B. e Moreira, M.A.** (1984). Variações genéticas na composição polipeptídica da proteína de soja. *Arq. Biol. Tecnol.* 27:319-328.
- Hajika, M., Igita, K. e Kitamura, K.** (1991). A line lacking all the seed lipoxygenase isozymes in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) induced by gamma-ray irradiation. *Jap. J. Breed.* 41:507-509.
- Hammond, E.G., Duvick, D.N., Fehr, W.R., Hildebrand, D.F., Lacefield, E.C. e Pfeiffer, T.W.** (1992). Rapid screening techniques for lipoxygenases in soybean seeds. *Crop Sci.* 32:820-821.
- Hildebrand, D.F. e Hymowitz, T.** (1981). Two soybean genotypes lacking lipoxygenase-1. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 49:33-35.
- Hill, J.E. e Breidenbach, R.W.** (1974). Proteins of soybean seeds. *Plant Physiol.* 53:742-746.
- Hiramoto, D.M. e Vello, N.A.** (1986). The genetic base of brazilian soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars. *Braz. J. Genet.* 9:295-306.
- Kitamura, K.** (1984). Biochemical characterization of lipoxygenase lacking mutants, L-1-less, L-2-less, and L-3-less soybeans. *Agric. Biol. Chem.* 48:2339-2346.
- Kitamura, K., Davies, C.S., Kaizuma, N. e Nielsen, N.C.** (1983). Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. *Crop Sci.* 23:924-927.
- Kitamura, K., Davies, C.S. e Nielsen, C.** (1984). Inheritance of alleles for Cgy1 and Gy4 storage protein genes in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 68:253-257.
- Kitamura, K., Kumagai, A. e Kikuchi, A.** (1985). Inheritance of lipoxygenase-2 and genetic relationship among genes for lipoxygenase-1, -2 and -3 isozymes in soybean seeds. *Jap. J. Breed.* 35:413-420.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

- Moreira, M.A., Hermodson, M.A., Larkins, B.A. e Nielsen, N.C.** (1979). Partial characterization of the acidic and basic poly peptides of glycinin. *J. Biol. Chem.* 254:9921-9926.
- Moreira, M.A., Hermodson, M.A., Larkins, B.A. e Nielsen, N.C.** (1981). Comparison of the primary structure of the acidic and basic polypeptides of glycinin. *Arch. Biochem. Biophys.* 210:663-642.
- Moreira, M.A., Tavares, S.R., Ramos, V. e Barros, E.G.** (1993). Hexanal production and TBA number are reduced in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds lacking lipoxygenase isozymes 2 and 3. *J. Agric. Food Chem.* 41:103-106.
- Panizzi, M.C.C.** (1987). Proteína para milhões. *Ci. Hoje* 6:25-31.
- Rackis, J.J., Sessa, D.J. e Honig, D.H.** (1979). Flavor problems of vegetable food proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56:262-271.
- Siedow, J.N.** (1991). Plant lipoxygenases: structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:145-188.
- Tanksley, V.H., Young, N.D., Paterson, A.H. e Bonierbale, M.W.** (1989). RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology* 7:257-264.
- Thanh, V.H. e Shibasaki, K.** (1977). Beta-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms. *Biochim. Biophys. Acta* 490:370-384.
- Tingey, S.V., Rafalski, A. e Williams, G.K.** (1992). Genetic analysis with RAPD markers. *Proceedings of the Symposium (on) Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*. Minneapolis, CSSA, ASHS, AGA, p 3-7.
- Vilarinhos, A.D., Barros, E.G., Paiva, E., Sedyama, C.S. e Moreira, M.A.** (1994). Use of random amplified polymorphic DNA technique to characterize soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes. *Brazil. J. Genet.* 17:287-290.

## MARCADOR RAPD LIGADO AO GENE Cgy1 DA PROTEÍNA DE RESERVA $\beta$ -CONGLICININA

### ABSTRACT

Random Amplified Polymorphic DNA and Bulk Segregant Analysis techniques were used to identify a molecular marker linked to Cgy1 gene. Leaf DNA was prepared from F<sub>2</sub> population derived from crosses between two genotypes contrasting for the presence of subunit of  $\beta$ -conglycinin. Leaf DNA samples extracted from F<sub>2</sub> homozygous plants for presence/absence of  $\alpha'$  subunit were used to construct the bulks, which were submitted to amplification reactions using about one thousand oligonucleotide primers decamers. Among them, primer OPZ05 generated a polymorphic band of 1040 bp, that co-segregated in the F<sub>2</sub> population with the recessive allele that leads to absence of the  $\alpha'$  subunit. This RAPD marker was estimated to be located in trans at 10.6 cM of the Cgy1 gene.

### RESUMO

As técnicas de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e BSA (Bulk Segregant Analysis) foram adotadas para identificar marcadores moleculares ligados ao gene Cgy1. Foram utilizadas amostras de DNA extraídas de folhas coletadas de plantas F<sub>2</sub> originadas do cruzamento entre genótipos contrastantes para a subunidade da  $\beta$ -conglucina. Amostras de DNA de plantas F<sub>2</sub> homocigotas para presença/ausência de  $\alpha'$  foram usadas para construção dos "bulks" que, em seguida, foram submetidos às reações de amplificações. Dentre os 1.000 "primers" decâmeros utilizados, o "primer" OPZ05 gerou uma banda polimórfica de 1.040pb, que co-segregou com a ausência da subunidade  $\alpha'$  na geração F<sub>2</sub>. A análise de ligação com "software" MapMaker indicou uma distância de 10,6 cM entre o marcador em trans e o gene Cgy1.

## INTRODUÇÃO

As variedades comerciais de soja geralmente apresentam de 40 a 45% de proteína na matéria seca. Da fração protéica total cerca de 70% é composta pelas globulinas, glicinina e  $\beta$ -conglucina. Ambas possuem baixo teor de aminoácidos sulfurados e isto contribui para a baixa qualidade nutricional da proteína da soja (Derbyshire *et al.*, 1976). Destas duas proteínas de reserva, a glicinina apresenta mais enxofre que a  $\beta$ -conglucina (Millerd, 1975), além disso, ambas são compostas de várias subunidades que diferem de 3 a 4 vezes na composição de aminoácidos sulfurados (Staswick *et al.*, 1981; Thanh e Shibasaki, 1977). A  $\beta$ -conglucina compõe-se de três subunidades principais denominadas  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ , codificadas pelos genes Cgy1, Cgy2 e Cgy3, que possuem 3, 2 e nenhum resíduo de metionina em suas cadeias polipeptídicas, respectivamente (Coates *et al.*, 1985), enquanto a glicinina é formada pelas subunidades G1, G2, G3, G4 e G5, cujos genes Gy1 a Gy5, respectivamente, apresentam conteúdos de até 8 resíduos de metionina na cadeia polipeptídica (Moreira *et al.*, 1979, 1981).

Glicinina e  $\beta$ -conglucina, além de possuírem subunidades exibindo diferentes conteúdos de metionina, apresentam diferentes propriedades funcionais. A glicinina é a proteína de reserva de soja com melhor capacidade de geleificação e promove maior firmeza do gel formado (Nakamura *et al.*, 1986; Kohyama *et al.*, 1992, 1995). A  $\beta$ -conglucina tem capacidade de adsorção de flavorizantes maior que a glicinina (O'Neil e Kinsella, 1987). Também existe interesse em eliminar ou diminuir teores das subunidades  $\alpha'$  e  $\alpha$  da  $\beta$ -conglucina, visando diminuir o potencial de alergenicidade em produtos protéicos de soja. Recentemente foi identificada uma proteína de soja (*Gly m Bd 30K*) com grande potencial alergênico, que se liga, especificamente, às subunidades  $\alpha'$  e  $\alpha$  por pontes bissulfídricas, durante o preparo de extratos

hidrossolúveis de soja, dificultando a remoção deste fator alergênico durante o processamento da soja (Samoto *et al.*, 1996).

A relação, ou proporção, dessas duas proteínas apresenta variação genética e ambiental (Hughes e Murphy, 1983; Murphy e Resurreccion, 1984; Cho *et al.*, 1987; Iwabuchi e Yamauchi, 1987). Além disso, existe mutante natural com ausência da subunidade  $\alpha'$  da  $\beta$ -conglucina (Kitamura *et al.*, 1984).

No Programa de Melhoramento Genético da Soja, visando à melhoria para consumo humano, em andamento na Universidade Federal de Viçosa, são utilizadas linhagens com ausência de enzima lipoxigenase, relacionada com sabor e estabilidade (Rackis *et al.*, 1979), e a variedade Keburi, com ausência da subunidade  $\alpha'$  da  $\beta$ -conglucina (Kitamura *et al.*, 1984).

Marcadores moleculares do tipo RFLP e RAPD têm sido utilizados, principalmente, no mapeamento de genes de resistência a doenças (Williams *et al.*, 1990; Michelmore *et al.*, 1991). Porém, o melhoramento vem enfocando outras características além das tradicionalmente estudadas. Em soja têm-se procurado, também, a alteração de composição e teores de produtos específicos (Verma e Schoemaker, 1995). No caso de proteína de reserva existe marcador molecular do tipo RFLP para o gene Cgy1 (Lelievre *et al.*, 1992), bem como marcadores para genes que codificam as outras subunidades de proteína de reserva (Nielsen, 1995). Marcadores RAPD oferecem maior simplicidade e rapidez, facilitando sua utilização num processo de seleção indireta associada às técnicas clássicas de melhoramento (Ferreira e Cratapaglia, 1995).

Nesse trabalho, a técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) foi utilizada, associada à estratégia do BSA (Bulked Segregant Analysis), tendo como objetivo identificar marcadores moleculares ligados ao gene Cgy1.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Materiais Genéticos e Cruzamentos:** Foram utilizados os seguintes genótipos: KC3 (ausência de  $\alpha'$ ) e PBTN (presença de  $\alpha'$ ). A linhagem KC3 foi originada do cruzamento de 'UFV 91.751' (derivada de cruzamentos entre 'Cristalina' e 'PI 86023' e 'Ichigowase', seguida de três gerações de retrocruzamento) com a variedade Keburi (ausência de  $\alpha'$ ). 'PBTN' foi derivada dos cruzamentos entre 'PB 2,3' ('Paranaíba' sem LOX 2 e 3) e uma linhagem obtida por radiação gama com ausência de LOX 1, 2 e 3.

Realizaram-se cruzamentos entre 'PBTN' (progenitor feminino) e 'KC3' (progenitor masculino). A efetividade dos cruzamentos foi verificada pela presença de LOX 1 nas sementes  $F_1$  (Hammond *et al.*, 1992).

As sementes foram plantadas em vasos em casa de vegetação e permitiu-se a autofecundação para obtenção de sementes  $F_2$  e  $F_3$ .

Utilizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970) nas sementes  $F_2$ , para verificar a presença ou ausência de  $\alpha'$ , e nas sementes  $F_3$ , para confirmar a homozigose da presença dessa subunidade protéica.

**Construção dos "Bulks":** Formaram-se dois "bulks" homozigotos contrastantes, um contendo a mistura de quantidades equivalentes de DNA extraídos de 7 plantas  $F_2$  com ausência de  $\alpha'$  e o outro, de 7 plantas com presença dessa subunidade (Michelmore *et al.*, 1991).

**Extração de DNA:** Após a confirmação do fenótipo, as sementes foram postas em germinador e as plântulas, transplantadas para casa de vegetação. Folhas jovens de plantas  $F_2$  foram coletadas e armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$  para extração de DNA. Foi utilizada a metodologia de Doyle e Doyle (1990). Basicamente, cerca de 250 mg de folha congelada foram macerados em tubos eppendorf com pistilo em  $\text{N}_2$  líquido. O tampão de extração, contendo 1% de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA, 100 mM de Tris-HCl,

pH 8, 1% de PVP (polivinil pirolidona) e 0,1% de 2-mercaptoetanol, foi pré-aquecido a 65 °C, e utilizado na relação 1:3 (p/v) de folha:tampão. O material foi incubado em banho-maria a 65 °C durante 40 minutos, com agitação suave em intervalos de 10 minutos. A desproteção foi realizada com clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v:v). Após centrifugação, o precipitado de ácidos nucleicos foi lavado com álcool etílico 70% e 95%. O RNA foi digerido durante 30 minutos a 37 °C, com RNase A 40 µg/ml de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8). O DNA em solução foi precipitado com NaCl 0,5 M, ressuspenso em TE, e sua qualidade e quantidade foram verificadas em gel de agarose 0,8%.

**Amplificação de DNA:** Esses “bulks” foram utilizados para as reações de amplificação. Cada reação de 25 µl continha: 30 ng de DNA; 100 µM de cada deoxiribonucleosídeo trifosfatado; 2,8 mM de MgCl<sub>2</sub>; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM de KCl; 0,4 µM de “primer” decâmero (Operon Technologies, Alameda, CA, USA); e uma unidade de *Taq* DNA polimerase. A amplificação foi realizada em termociclador, modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus Corp., Norwalk, Conn., USA) programado para 40 ciclos. Cada ciclo consistia de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, pareamento a 35 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Após o 40<sup>o</sup> ciclo, utilizou-se passo adicional de 72 °C durante 7 minutos. Os produtos de amplificação foram separados em géis de agarose 1,2% imersos em tampão TBE (90 mM de Tris-borato, 1 mM de EDTA, pH 8) contendo 0,2 µg/ml de brometo de etídio. Após corrida a 100V durante 4 horas, as bandas de DNA foram visualizadas sob luz UV, e a imagem foi fotodocumentada em sistema EAGLE EYE II (Stratagene).

Foram utilizados 1.000 “primers” decâmeros, séries A a W e AA a AW, e consideraram-se somente bandas polimórficas proeminentes.

Utilizou-se DNA de fago λ, digerido com enzimas *Bam*HI, *Eco*RI e *Hind*III, como padrão de tamanho de fragmento (Sambrook *et al.*, 1989).

**Estimativa da Distância Genética:** Utilizou-se o “software” Map Maker v.2, para calcular a distância genética com dados compilados de 171 indivíduos F<sub>2</sub>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise de 171 sementes  $F_2$  do cruzamento 'PBTN' x 'KC3', utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, verificaram-se 127 sementes com presença de  $\alpha'$  e 44 sementes com ausência desta subunidade (Tabela 1).

O "primer" OPZ05 (5' TCCATGCTG 3') gerou uma banda polimórfica de 1.040 pb, em repulsão ao gene que codifica a subunidade  $\alpha'$ . A análise de 171 indivíduos  $F_2$  em software MapMaker v.2 indicou que esse marcador está ligado à uma distância de 10,6 cM do gene.

O marcador identificado apresenta natureza dominante, característica típica de marcador RAPD (Rafalski *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1990). O fragmento OPZ05<sub>1040</sub> está ausente nos indivíduos homozigotos para presença de  $\alpha'$  e presente nos indivíduos heterozigotos e naqueles com ausência desta subunidade (Figura 1). Entre os indivíduos sem  $\alpha'$ , somente dois recombinantes não apresentaram a banda polimórfica ligada à característica.

Tabela 1 - Frequências observadas e esperadas de  $\alpha'$  em sementes  $F_2$  do cruzamento 'PBTN' x 'KC3', valor de  $\chi^2$  calculado e nível de probabilidade

Genótipo	Frequência		$\chi^2$	Probabilidade
	observada	esperada		
Cgy1 _	127,00	128,25	0,0487	0,90 -0,80
cgy1cgy1	44,00	42,75		

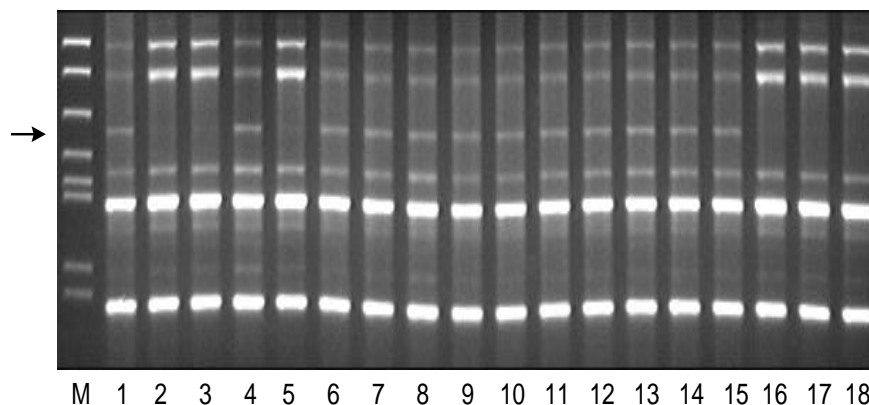


Figura 1- Eletroforese dos produtos de amplificação com o primer OPZ05 de DNA dos progenitores KC3 e PBTN (colunas 1 e 2), de variedade comercial (coluna 3), da planta F<sub>1</sub> (coluna 4), dos “bulks” com presença e ausência de  $\alpha'$  (colunas 5 e 6) e das plantas F<sub>2</sub> derivadas desse cruzamento, com ausência (colunas de 7 a 9), presença em heterozigose (colunas de 10 a 15) e em homozigose (colunas de 16 a 18) da subunidade  $\alpha'$  - a coluna M corresponde ao DNA do fago  $\lambda$  digerido com *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII* (marcadores de tamanho dos fragmentos de DNA); a seta indica a banda de 1.040 bp ligada em repulsão ao gene *Cgy1*.

O marcador OPZ05<sub>1040</sub> poderá ser útil para verificar a efetividade de cruzamentos em que o progenitor masculino não possuir  $\alpha'$  e também em retrocruzamentos cujo progenitor não recorrente não apresentar esta subunidade.

Com a utilização do marcador OPZ05<sub>1040</sub> poderão ser excluídas as gerações de autofecundação após os ciclos de retrocruzamentos, pois é possível discriminar entre sementes com  $\alpha'$  (*Cgy1Cgy1* ou *Cgy1cgy1*) aquelas heterozigotas (*Cgy1cgy1*). Além disso, o marcador permite a seleção precoce e conseqüentemente diminui o número de plantas que seriam conduzidas até o final do período reprodutivo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cho, R.K., Iwamoto, M. e Saio, K.** (1987). Determination of 7S and 11S globulins in ground whole soybeans by near infrared reflectance spectroscopic analysis. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 34: 666-672.
- Coates, J.B., Medeiros, J.S., Thanh, V.H. e Nielsen, N.C.** (1985). Characterization of the subunits of  $\beta$ -conglycinin. *Arch. Biochem. Biophys.* 243: 184-194.
- Derbyshire, E., Wright, D.J. e Boulter, D.** (1976). Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* 15: 3-24.
- Doyle, J.J. e Doyle, J.L.** (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Ferreira, M.E. e Cratapaglia, D.** (1995). *Introdução ao uso de marcadores moleculares moleculares RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília. EMBRAPA-CENARGEM. 220p.
- Hammond, E.G., Duvick, D.N., Fehr, W.R., Hildebrand, D.F., Lacefield, E.C. e Pfeiffer, T.W.** (1992). Rapid screening techniques for lipoxygenases in soybean seeds. *Crop Sci.* 32: 820-821.
- Hughes, S.A. e Murphy, P.A.** (1983). Varietal influence on the quantity of glycinin in soybeans. *J. Agric. Food Chem.* 31: 376-379.
- Iwabuchi, S. e Yamauchi, F.M.** (1987). Determination of glycinin and  $\beta$ -conglycinin in soybean proteins by immunological methods. *J. Agric. Food Chem.* 35: 200-205.
- Kitamura, K., Davies, C.S. e Nielsen, N.C.** (1984). Inheritance of alleles for Cgy1 and Gy4 storage protein genes in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 68: 253-257.
- Kohyama, K., Yoshida, M. e Nishinari, K.** (1992). Rheological study on gelation of soybean 11S protein by glucono- $\delta$ -lactone. *J. Agric. Food Chem.* 40: 740-744.
- Kohyama, K., Murata, M., Tani, F., Sano, Y. e Doi, E.** (1995). Effects of protein composition on gelation of mixtures containing soybean 7S and 11S globulins. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 240-245.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- Lelievre, J.M., Dickinson, C.D., Dickinson, L.A. e Nielsen, N.C.** (1992). Synthesis and assembly of soybean  $\beta$ -conglycinin *in vitro*. *Plant Mol. Biol.* 18: 259-274.
- Michelmore, R.W., Paran, I. e Kesseli, R.** (1991). Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8: 9828-9832.
- Miller, A.** (1975). Biochemistry of legume seed proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 26: 53-72.
- Moreira, M.A., Hermodson, M.A., Larkins, B.A. e Nielsen, N.C.** (1979). Partial characterization of the acidic and basic poly peptides of glycinin. *J. Biol. Chem.* 254: 9921-9926.
- Moreira M.A., Hermodson, M.A., Larkins, B.A. e Nielsen, N.C.** (1981). Comparison of the primary structure of the acidic polypeptides of glycinin. *Arch. Biochem. Biophys.* 210: 663-642.
- Murphy, P.A. e Resurreccion, A.P.** (1984). Varietal and environmental differences in soybean glycinin and  $\beta$ -conglycinin content. *J. Agric. Food Chem.* 32: 911-915.
- Nakamura, T., Utsumi, S. e Mori, T.** (1986). Mechanism of heat-induced gelation and gel properties of soybean 7S globulin. *Agric. Biol. Chem.* 50: 1287-1293.
- Nielsen, N.C.** (1995). Soybean seed composition. In: *Soybean genetics, molecular biology and biotechnology*. (Verma, D.P.S., Schoemaker, R.C., eds.) . CAB International. 279 p. p.127-164.
- O'Neill, T.E. e Kinsella, J.E.** (1987). Flavor protein interaction characterization of 2-nonanone binding to isolated soy protein fractions. *J. Food Sci.* 52: 98-101.
- Rackis, J.J., Sessa, D.J. e Honig, D.H.** (1979). Flavor problems of vegetable food proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56: 262-271.
- Rafalski, J.A., Tingey, S.V. e Williams, J.G.K.** (1991). RAPD markers - a new technology for genetic mapping and plant breeding. *AgBiotech News Inform.* 3: 645-648.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. e Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. V. 3. 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.

- Samoto, M., Miyazaki, C., Akasaka, T., Mori, H. e Kawamura, Y.** (1996). Specific binding of allergenic soybean protein *Gly m Bd 30K* with  $\alpha'$ - and  $\alpha$ -subunits of conglycinin in soy milk. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 1006-1010.
- Staswick, P.E., Hermodson, M.A. e Nielsen, N.C.** (1981). Identification of the acidic and basic complexes of glycinin. *J. Biol. Chem.* 256: 8752-8755.
- Thanh, V.H. e Shibasaki, K.** (1977).  $\beta$ -conglycinin from soybeans proteins: isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms. *Biochim. Biophys. Acta* 490: 370-374.
- Verma, D.P.S. e Schoemaker, R.C.** (1995) *Soybean genetics, molecular biology and biotechnology*. CAB International.. 279 p.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. e Tingey, S.V.** (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

### 3. RESUMO E CONCLUSÕES

Objetivando eliminar geneticamente as lipoxigenases (LOX) de sementes e as subunidades de proteínas de reserva,  $\alpha'$  e G4, e verificar o efeito dessas eliminações na qualidade da soja para a agroindústria, foram realizados cruzamentos entre os genótipos UFV91.751, Keburi e PBTN. A linhagem UFV91.751 não apresenta as isoenzimas LOX2 e LOX3 em suas sementes, enquanto a variedade Keburi não apresenta a subunidade  $\alpha'$  e PBTN não apresenta as três isoenzimas lipoxigenases e a subunidade G4. Foram selecionadas linhagens sem LOX com presença e, ou, ausência de  $\alpha'$  e G4. Nas sementes destas linhagens, de seus progenitores e da variedade Cristalina foram analisados os teores de proteína total, lipídio, aminoácidos, ácidos graxos, além das subunidades componentes das proteínas de reserva e produção de hexanal.

A eliminação genética de LOX e das subunidades  $\alpha'$  e G4 não promoveram redução nos teores de proteína total ou das proteínas de reserva 7S e 11S das sementes de soja. A eliminação genética de lipoxigenases de sementes promoveu uma redução drástica na produção de hexanal, um dos principais compostos responsáveis pelos sabores característicos de produtos protéicos derivados de soja, indicando melhoria de sabor para consumo humano, nos genótipos sem lipoxigenases nas

sementes. Observou-se diminuição do teor de metionina com a eliminação genética de  $\alpha'$ . Esses dados podem ser explicados pelo aumento verificado na síntese de subunidades de  $\beta$ -conglucina com menores teores de metionina ( $\alpha$  e  $\beta$ ). Por outro lado, verificou-se aumento do teor de metionina na proteína da soja com a eliminação genética da subunidade G4. Esses resultados também foram justificados pela observação de uma maior síntese nestes genótipos de subunidades componentes de glicina (G1, G2 e G3) com maiores conteúdos de metionina.

Com o objetivo de verificar a eficiência da técnica de RAPD-PCR em discriminar distâncias genéticas entre indivíduos selecionados como progenitores não-recorrentes e uma linhagem recorrente, estimaram-se as distâncias genéticas em populações  $F_2$  e  $F_3$ , selecionadas para ausência de lipoxigenases (LOX) e das subunidades protéicas  $\alpha'$  e G4, em relação à linhagem PB2,3 (linhagem sem LOX2 e 3) a ser usada como progenitor recorrente. Essas populações são oriundas do cruzamento [PBTN(UFV91.751)Keburi]. Nas estimativas das distâncias genéticas foram utilizadas características fenotípicas e a técnica de RAPD-PCR. Para os cálculos de distâncias genéticas estimadas por meio de dados fenotípicos utilizou-se a distância euclidiana média com dados transformados e, para os dados obtidos com marcadores RAPD, a distância calculada pelo complemento da coincidência simples. Ambos os tipos de seleção discriminaram indivíduos, potencialmente, mais próximos da linhagem PB2,3, porém com baixo grau de coincidência, dependendo da pressão de seleção utilizada. Baseado nesses resultados, propõe-se a utilização conjunta de distâncias genéticas estimadas por meio de marcadores RAPD e de dados fenotípicos numa população, em que seria realizada uma pré-seleção durante o período vegetativo das plantas, por meio das distâncias genéticas estimadas com marcadores RAPD. As plantas pré-selecionadas seriam avaliadas posteriormente, por meio de características fenotípicas. Tendo em vista que marcadores RAPD não sofrem influência do ambiente, a pré-seleção apresenta a vantagem de diminuir a população a ser conduzida.

As técnicas de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e BSA (Bulked Segregant Analysis) foram utilizadas para identificar marcadores moleculares ligados ao gene Cgy1. Foram utilizadas amostras de DNA extraídas de folhas coletadas de plantas F<sub>2</sub> originadas do cruzamento entre genótipos contrastantes para a subunidade  $\alpha'$  da  $\beta$ -conglucina. Amostras de DNA de plantas F<sub>2</sub> homocigotas para presença/ausência  $\alpha'$  foram utilizadas para construção dos bulks que, em seguida, foram submetidos às reações de amplificações. Dentre os 1.000 “primers” decâmeros utilizados, o “primer” OPZ05 gerou uma banda polimórfica de 1.040 pb, que cosegregou com a ausência da subunidade  $\alpha'$  na geração F<sub>2</sub>. A análise de ligação com “software” MapMaker indicou uma distância de 10,6 cM entre o marcador em trans e o gene Cgy1.

### 3 APÊNDICE

Quadro 1A - Resumo das análises de variância de teores de proteína e óleo e produção de hexanal avaliados em oito genótipos de soja

Fonte de Variação	G.L.	QM Proteína	QM Óleo	QM Hexanal
Bloco	2	0,029228	0,261045*	112660,9
Genótipos	7	13,30263**	117,9395**	440,375**
Resíduo	14	0,523872	0,493507	381,0402
Média		40,62	19,14	112,63
C.V. (%)		1,78	0,98	17,33

<sup>o</sup> Significativo a 10%.

\* Significativo a 5%.

\*\* Significativo a 1%.

Quadro 2A - Resumo das análises de variância de teores de ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido linoléico e ácido linolênico avaliados em oito genótipos de soja

Fonte de Variação	GL	QM Palmítico	QM Esteárico	QM Oléico	QM Linoléico	QM Linolênico
Bloco	1	0,009905	0,003004 <sup>o</sup>	0,003004 <sup>o</sup>	0,046667	0,000032
Genótipos	7	1,087227**	0,098586**	0,098586**	30,76283**	3,365803**
Resíduo	7	0,015479	0,000757	0,000757	0,020776	0,040020
Média		11,66	2,95	22,16	54,28	8,95
C.V. (%)		1,07	0,93	0,42	0,26	2,24

<sup>o</sup> Significativo a 10%.

\* Significativo a 5%.

\*\* Significativo a 1%.

Quadro 3A - Resumo das análises de variância de teores de proteína de reserva, proteína 7S, proteína 11S, relação 7S/11S, subunidades GA, subunidades GB, relação GA/GB avaliados em oito genótipos de soja

Fonte de Variação	Bloco	Genótipos	Resíduo	Média	C.V. (%)	
	GL	3	7			21
QM Prot		111,9813	29,8020	64,23053	72,89	10,99
QM 7 S		56,49849*	94,6357**	11,81866	32,09	10,71
QM 11 S		56,49847*	94,6358**	11,81865	67,91	5,06
QM GA		2,12398	169,4028**	6,17428	80,10	3,10
QM GB		2,12398	169,4028**	6,17428	19,89	12,49
QM 7S/11S		0,02942*	0,0567**	0,00626	0,48	16,34
QM GA/GB		0,26012*	21,0797**	0,33728	4,7	12,36

<sup>o</sup> Significativo a 10%.

\* Significativo a 5%.

\*\* Significativo a 1%.

Quadro 4A - Resumo das análises de variância de teores de aminoácidos avaliados em oito genótipos de soja

Fonte de Variação	Genótipos	Bloco	Resíduo	Média	C.V. (%)
GL	7	1	7		
QM Lys	0,64514**	0,00283	0,07671	7,01	3,95
QM His	0,13508**	0,00903	0,01001	2,90	3,45
QM Arg	1,33847**	0,10065**	0,06085	8,54	2,89
QM Asp+Asn	1,08644**	1,84212**	0,07128	12,55	2,13
QM Thr	0,12535 <sup>o</sup>	0,07744	0,03953	4,26	4,66
QM Ser	0,18702*	0,04059	0,04916	5,06	4,38
QM Glu+Gln	2,72561*	2,00497 <sup>o</sup>	0,42631	19,76	3,30
QM Pro	0,12680	0,09804	0,07429	5,56	4,91
QM Gly	0,26797**	0,00020	0,03753	4,54	4,26
QM Ala	0,24630**	0,00149	0,02781	4,66	3,58
QM Cys	0,11244**	0,01165	0,00520	1,52	4,73
QM Val	0,66056 <sup>o</sup>	0,04055	0,18466	5,17	8,31
QM Met	0,30042**	0,00487	0,00507	1,77	4,02
QM Ile	1,10146	0,97776	2,18758	4,81	3,07
QM Leu	1,13150**	0,00482	0,14897	8,27	4,67
QM Tyr	0,52347*	0,00974	0,11944	3,76	9,19
QM Phe	0,46028**	0,00000	0,05713	5,62	4,25

<sup>o</sup> Significativo a 10%.

\* Significativo a 5%.

\*\* Significativo a 1%.

Quadro 5A - Desdobramento da análise de variância de teores de metionina e cisteína

	Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Quadrado Médio
Metionina	$\alpha'$ presente vs. $\alpha'$ ausente	1	0,100697**
	G4 presente vs. G4 ausente	1	0,100697**
Cisteína	$\alpha'$ presente vs. $\alpha'$ ausente	1	0,10198**
	G4 presente vs. G4 ausente	1	0,10198**

\*\* Significativo a 1% de probabilidade.

Tabela 8 - Matriz de dissimilaridade aos pares entre os indivíduos F<sub>2</sub> do cruzamento ['PBTN' x ('UFV 91.751' x 'Keburi')] e 'PB 2,3', baseada em marcadores RAPD (distâncias genéticas aos pares estimadas como complemento da coincidência simples)

Tabela 9 - Matriz de dissimilaridade entre os indivíduos  $F_3$  do cruzamento ['PBTN' x ('UFV 91.751' x 'Keburi')] e 'PB 2,3', baseada em dados fenotípicos (distâncias genéticas aos pares estimadas como distância euclidiana média com dados transformados)

Tabela 10 - Matriz de dissimilaridade entre os indivíduos  $F_3$  do cruzamento ['PBTN' x ('UFV 91.751' x 'Keburi')] e 'PB 2,3', baseada em marcadores RAPD (distâncias genéticas aos pares estimadas como complemento da coincidência simples)

Tabela 5 - Composição aminoacídica da proteína total de sementes de genótipos de soja (g/100 g de proteína)

Aminoácido	Cristalina	Keburi	UFV 91.751	PBTN	KCP 1	KCP 2	KCP 3	KCP 4	Média	C.V. (%)
Lys	7,60 a	7,69 a	6,12 d	6,49 d	6,72 cd	7,21 abc	7,47 ab	6,80 bcd	7,01	3,95
His	3,35 a	3,13 ab	2,55 e	2,69 de	2,94 bcd	3,02 bc	2,77 de	2,78 cde	2,90	3,45
Arg	9,14 a	9,41 a	7,33 c	7,46 c	8,41 b	9,21 a	8,21 b	9,14 a	8,54	2,89
Asp + Asn	11,85 de	12,46 cd	12,36 cd	11,60 e	13,38 ab	12,78 bc	13,77 a	12,18 cde	12,55	2,13
Thr	4,11 bc	4,67 a	4,05 bc	4,07 bc	4,44 abc	4,29 abc	4,49 ab	3,97 c	4,26	4,66
Ser	4,59 c	5,11 abc	4,89 bc	5,21 ab	5,62 a	5,11 abc	5,15 abc	4,80 bc	5,06	4,38
Glu + Gln	19,17 bc	18,27 c	18,81 c	19,28 bc	20,77 ab	21,05 a	21,46 a	19,25 bc	19,76	3,30
Pro	5,39 ab	5,53 ab	5,80 ab	5,50 ab	5,44 ab	6,05 a	5,27 b	5,44 ab	5,56	4,91
Gly	4,41 bc	4,32 bc	4,28 bc	4,63 bc	4,77 b	4,48 bc	5,30 a	4,15 c	4,54	4,26
Ala	4,66 bc	4,51 bc	4,50 bc	4,28 c	4,86 b	4,79 b	5,36 a	4,32 c	4,66	3,58
Cys	1,26 d	1,42 cd	1,31 cd	1,96 a	1,69 b	1,48 c	1,69 b	1,38 cd	1,52	4,73
Val	5,14 abc	4,86 bc	4,55 c	5,74 ab	4,75 bc	5,44 abc	6,19 a	4,70 bc	5,17	8,31
Met	1,03 d	1,50 c	1,98 b	2,34 a	1,83 b	1,96 b	1,66 c	1,89 b	1,77	4,02
Ile	4,99 a	5,49 a	4,55 a	5,84 a	4,51 a	4,92 a	3,35 a	4,85 a	4,81	3,07
Leu	8,62 bc	7,76 cd	7,61 d	9,58 a	8,07 cd	7,85 cd	9,12 ab	7,57 d	8,27	4,67
Tyr	3,74 bc	3,55 bc	3,48 bc	4,81 a	3,60 bc	3,42 bc	4,21 ab	3,26 c	3,76	9,19
Phe	5,57 bcd	5,01 d	5,48 cd	6,15 ab	5,59 bcd	5,62 bc	6,44 a	5,10 cd	5,62	4,25

Médias, na linha, com mesmas letras não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

