

**MARCOS DE OLIVEIRA PINTO**

**REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS  
INSATURADOS DURANTE A ONTOGENIA DE  
SEMENTES DE SOJA**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008**

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

T

P659r  
2008

Pinto, Marcos de Oliveira, 1983-  
Regulação da biossíntese de ácidos graxos insaturados  
durante a ontogenia de sementes de soja / Marcos de  
Oliveira Pinto. – Viçosa, MG, 2008.  
xi, 76f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 49-56.

1. Soja - Melhoramento genético. 2. Ontogenia. 3. Ácidos  
graxos Ômega-6 - Síntese. 4. Ácidos graxos Ômega-3 -  
Síntese. 5. Genética vegetal. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

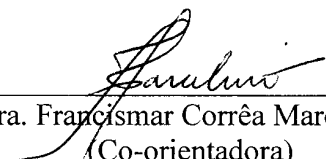
CDD 22.ed. 633.342

MARCOS DE OLIVEIRA PINTO

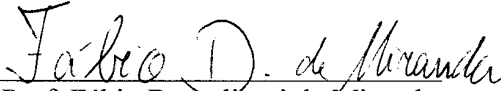
**REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS  
INSATURADOS DURANTE A ONTOGENIA DE  
SEMENTES DE SOJA**

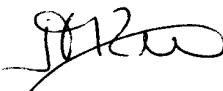
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

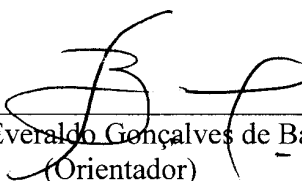
APROVADA: 14 de julho de 2008.

  
Dra. Francismar Corrêa Marcelino  
(Co-orientadora)

  
Prof. Valéria Monteze Guimarães

  
Prof. Fábio Demolinari de Miranda

  
Prof. Sebastião Tavares de Rezende

  
Prof. Everaldo Gonçalves de Barros  
(Orientador)

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Pedro e Maria das Graças

Aos meus avôs paternos, Raimundo e Irani (*in memoriam*)

Aos meus avôs maternos, Antônio (*in memoriam*) e Josefa

A minha irmã, Dirlene

A minha namorada, Carla

Aos meus familiares

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária – BIOAGRO – pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade oferecida para realização desse curso, ampliando os meus conhecimentos.

A todos os professores da UFV, especialmente aos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que contribuíram muito na minha formação acadêmica e pessoal.

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

Aos meus familiares, principalmente meu pai e minha mãe, que me apoiaram durante essa longa caminhada.

À minha namorada Carla, pelo companheirismo, incentivo e carinho.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela amizade, dedicação, carinho e orientação durante a realização desse trabalho e pelo forte apoio nos momentos de grandes dificuldades pessoais e profissionais.

Ao Professor Maurílio Alves Moreira pela amizade, apoio e confiança.

À Francimar Corrêa Marcelino pela amizade, orientação e ajuda nos experimentos de expressão gênica.

Ao Doutor Fábio e aos Professores Sebastião e Valéria por aceitarem participar da minha banca de dissertação e pelas sugestões que foram muito valiosas para a versão final dessa dissertação.

Ao Pedro Ivo Good God, pela amizade, orientação e acompanhamento nos experimentos.

Ao Newton Deniz Piovesan, pelos esclarecimentos e ajuda durante o trabalho.

À Empresa AgroGenética, por ter possibilitado a realização dos experimentos envolvendo PCR-quantitativo e a todos os seus funcionários que colaboraram para a realização desse trabalho.

À Sandra, pela amizade e ajuda nos experimentos de cromatografia gasosa.

À estudante de iniciação científica Danielle Fernandes, pela dedicação e contribuição para a realização desse trabalho.

À Maria Fernanda que me ensinou os primeiros passos no laboratório, contribuindo muito para minha formação profissional.

Aos amigos dos laboratórios Proteína, Biomol, Seqüenciamento e de Análises Bioquímicas por toda ajuda e agradável convivência.

Aos companheiros de curso de graduação e pós-graduação, e amigos da UFV, pelos ensinamentos, convívio e amizade.

Aos meus amigos da República Fundu du Poço e do Alojamento 1421 – Sávio, André, Alan, Hamilton, Guilherme, Márcio, Alberto, Rafael, Magno e Cleiton – pela farra, amizade e companheirismo.

A todos aqueles que colaboraram e torceram pelo meu sucesso.

## **BIOGRAFIA**

Marcos de Oliveira Pinto, filho de Pedro Pinto Barbosa e Maria das Graças Dantas de Oliveira Pinto, nasceu em São João de Meriti, Estado do Rio de Janeiro, em 23 de janeiro de 1983.

Em outubro do ano de 2006, formou-se em Bacharel em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa – UFV – em Viçosa, Minas Gerais.

Em outubro de 2006, ingressou no Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa – UFV – em Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se à defesa de tese em julho de 2008.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA SOJA .....	03
2.2. QUALIDADE DO ÓLEO .....	04
2.3. BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS.....	07
2.4. DESSATURASES E BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS .....	10
3. OBJETIVOS .....	15
3.1. OBJETIVO GERAL .....	15
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
4.1. MATERIAL GENÉTICO.....	16
4.2. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS ÁCIDOS GRAXOS.....	17
4.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO TOTAL .....	17
4.4. ATIVIDADE RELATIVA DAS DESSATURASES .....	18
4.5. ANÁLISE DO ACÚMULO DE TRANSCRITO POR PCR EM TEMPO REAL .....	18
4.5.1. Extração de RNA total de sementes de soja .....	18
4.5.2. Síntese de cDNA .....	19
4.5.3. Confeção dos <i>primers</i> para PCR em tempo real.....	20
4.5.4. Análise do PCR em tempo real .....	21

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
5.1. CONCENTRAÇÕES DOS ÁCIDOS GRAXOS.....	23
5.2. CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO TOTAL.....	27
5.3. ATIVIDADE RELATIVA DAS DESSATURASES .....	28
5.4. ANÁLISE DO ACÚMULO DE TRANSCRITO .....	32
5.4.1. Confeção dos <i>primers</i> .....	32
5.4.2. Condições das reações de amplificação.....	34
5.4.3. Acúmulo de transcritos que codificam para as dessaturases.....	36
5.4.3.1 Acúmulo de transcritos que codificam para as $\omega$ -6-dessaturases .....	37
5.4.3.1 Acúmulo de transcritos que codificam para as $\omega$ -3-dessaturases .....	43
6. CONCLUSÕES.....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
APÊNDICE .....	57

## RESUMO

PINTO, Marcos de Oliveira M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho 2008.

**Regulação da biossíntese de ácidos graxos insaturados durante a ontogenia de sementes de soja.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-orientadores: Maurílio Alves Moreira e Francismar Corrêa Marcelino.

A composição de ácidos graxos na fração óleo da soja influencia diretamente na sua estabilidade oxidativa. Conteúdos elevados de ácidos graxos polinsaturados, tais como o linoléico e linolênico, resultam em óleos mais susceptíveis a degradações hidrolíticas e oxidativas, levando à formação de compostos voláteis que alteram a qualidade e sabor dos alimentos. Assim, a tendência atual do mercado alimentício é buscar óleos com conteúdos mais elevados de ácidos graxos monoinsaturados e reduzido conteúdo de ácido linolênico. A regulação da via de biossíntese de ácidos graxos polinsaturados em sementes de soja possivelmente envolve controle transcricional e pós-transcricional das  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 dessaturases. No entanto, os mecanismos precisos de controle ainda não são muito claros. O presente trabalho está inserido no Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja (PMQS) do BIOAGRO/UFV e tem como principal objetivo determinar os níveis de mRNAs das principais dessaturases de soja durante o desenvolvimento da semente, correlacionando-os com as concentrações relativas de ácidos graxos e atividade enzimática em diferentes cultivares durante o enchimento do grão. Para isso, foram utilizados os genótipos: A29, com baixa concentração de ácido linolênico (~1%); FA22, com elevada concentração de ácido oléico (~50%); N85-2176, com baixa concentração de ácido linolênico (~3%) e concentração média de ácido oléico (~30%); e Tucunaré, variedade comercial com concentrações normais de ácido oléico (~19%) e ácido linolênico (~8%). As sementes de soja foram subdivididas em cinco estádios de desenvolvimento de acordo com o seu peso úmido: 1° (0-125 mg); 2° (126-250 mg); 3° (251-375 mg), 4° (376-450 mg) e 5° (semente madura). Foram determinados: as concentrações de ácidos graxos; a concentração de óleo total; as atividades enzimáticas relativas das  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3-dessaturases; e a expressão dos genes de *FAD2-1* e *FAD2-2*, que codificam as  $\omega$ -6-dessaturases, e *GmFAD3A*, *GmFAD3B* e *GmFAD3C*, que codificam as  $\omega$ -3-dessaturases. De modo geral, a concentração de ácido oléico aumentou do 1° ao 4° estágio tendo uma redução entre o 4° e 5° estádios. O genótipo FA22, seguido de N85-2176, apresentou a maior concentração de ácido oléico durante todo o desenvolvimento da semente. Para o conteúdo de ácido linolênico,

observou-se uma redução drástica do 1° ao 3° estágio em todos os genótipos. O genótipo A29, seguido de N85-2176, apresentou a menor concentração de ácido linolênico durante todo o desenvolvimento da semente. A concentração de óleo total nas sementes maduras fisiologicamente (5° estágio) foi de 22% para Tucunaré, 24% para A29, 21% para N85-2176 e 19% para FA22. A atividade enzimática relativa foi estimada com base nas concentrações médias dos ácidos graxos e não foi conclusiva, sendo necessárias determinações posteriores de atividade *in vitro*. Os níveis de transcritos do gene *FAD2-1* foram superiores aos do gene *FAD2-2*, sendo que o acúmulo de transcritos de *FAD2-1* foi menor nos estágios iniciais e aumentou com o desenvolvimento da semente, enquanto que para o gene *FAD2-2* os níveis de transcritos reduziram com o desenvolvimento da semente. Esses resultados estão coerentes com a idéia de que *FAD2-1* está relacionado com a biossíntese de ácido graxos de reserva em sementes e *FAD2-2*, com a biossíntese de ácido graxos de membrana. Embora os genótipos FA22 e N85-2176 apresentem elevadas concentrações de ácido oléico, o mesmo não pode ser explicado pela redução na expressão dos genes *FAD2-1* e *FAD2-2*, evidenciando a existência de mecanismos de regulação pós-transcricionais, ou até mesmo a presença de outros genes que controlem esta característica. Os níveis de transcritos do gene *GmFAD3A* foram superiores aos demais genes *GmFAD3B* e *GmFAD3C* no genótipo Tucunaré. Os acúmulos de transcritos do gene *GmFAD3A* foram praticamente nulos em A29 e N85-2176, enquanto *GmFAD3B* apresentou baixo acúmulo de transcritos em A29. Tal fato explica as baixas concentrações de ácido linolênico observados nesses genótipos. Mecanismos de regulação pós-transcricionais devem alterar a expressão final do gene *GmFAD3C*, que codifica a  $\omega$ -3-dessaturase neste genótipo, uma vez que A29 possui mutação nesse gene e nenhuma alteração no seu perfil de acúmulo de mRNA foi observado.

## ABSTRACT

PINTO, Marcos de Oliveira M. S. Universidade Federal de Viçosa, July 2008.

**Regulation of the unsaturated fatty acid biosynthesis during the ontogeny of soybean seeds.** Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Co Advisers: Maurílio Alves Moreira and Francismar Corrêa Marcelino.

The fatty acid composition of soybean seeds has a direct impact on its oxidative stability. High levels of polyunsaturated fatty acids such as linoleic and linolenic acids make the oil more susceptible to hydrolytic and oxidative degradation leading to the formation of volatile compounds which alter the quality and flavor of foods. For this reason, there is a world demand for oils with high content of monounsaturated fatty acids and reduced levels of linolenic acid. The regulation of the fatty acid biosynthetic pathway in soybean seeds possibly involves transcriptional and post-transcriptional control of the  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 desaturases. However, the precise control mechanism is not known. The present work is part of the Breeding Program for Soybean Quality developed at BIOAGRO/UFV and its main goal is to determine the mRNA levels of the main desaturases during the development of soybean seeds, and to correlate them with the fatty acid levels and the enzymatic activities in different genotypes during seed filling. The following genotypes were used: A29, low linolenic acid content (~1%); FA22, high oleic content (~50%); N85-2176, low linolenic acid content (~3%) and medium oleic acid content (~30%); and Tucunaré, commercial cultivar with normal contents of oleic (~19%) and linolenic acids (~8%). The seeds were divided into five stages according to their fresh weight: 1<sup>st</sup> (0-125 mg); 2<sup>nd</sup> (126-250 mg); 3<sup>rd</sup> (251-375 mg), 4<sup>th</sup> (376-450 mg) and 5<sup>th</sup> (dry seed). The following parameters were determined: fatty acid content; total oil content; relative enzymatic activities of  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3-desaturases; mRNA levels of *FAD2-1* and *FAD2-2* genes which encode the  $\omega$ -6-desaturases, and of genes *GmFAD3A*, *GmFAD3B* and *GmFAD3C*, which encode the  $\omega$ -3-desaturases. The results show that the oleic acid content increased between the 1<sup>st</sup> and 4<sup>th</sup> stages and reduced after that. The genotype FA22, followed by N85-2176, presented the highest oleic acid content during the development of the seed. As for the linolenic acid a drastic reduction was observed between the 1<sup>st</sup> and the 3<sup>rd</sup> stages in all genotypes. The genotype A29, followed by N85-2176 presented the lowest linolenic acid content during the development of the seed. The total oil content in mature seeds (5<sup>th</sup> stage) was 22% for Tucunaré, 24% for A29, 21% for N85-2176 and 19% for FA22. The values

obtained for the desaturases relative activities were proportional to the average concentrations of the fatty acids in the genotypes. The relative enzymatic activities estimated as a function of the average contents of the fatty acids did not allow much conclusion and further determinations *in vitro* are necessary. The amount of transcripts for *FAD2-1* was higher than that of *FAD2-2*. *FAD2-1* levels were low in the first stages of development and increased with time, whereas *FAD2-2* levels reduced with the development of the seed. These results are in accordance with the idea that *FAD2-1* is related with the biosynthesis of storage fatty acids in the seeds and *FAD2-2*, with the biosynthesis of membrane fatty acid. Although genotypes FA22 and N85-2176 present high oleic acid contents, this fact cannot be explained by the reduction on transcript levels for the genes *FAD2-2* and *FAD2-1*. This indicates that post-transcriptional events or even other genes control the expression of this trait. Transcript levels for the *GmFAD3A* gene were higher than those of the *GmFAD3B* and *GmFAD3C* genes in all genotypes tested. The transcripts for the *GmFAD3A* gene were barely detected in genotypes A29 and N85-2176, whereas *GmFAD3B* transcript levels were extremely low in A29. This fact explains the low level of linolenic acid in this genotype. It is conceivable that post-transcriptional control events regulate the expression of the *GmFAD3C* gene which encodes for the  $\omega$ -3-desaturase in A29 as this genotype harbors a mutation in this gene and no alteration has been detected in the corresponding transcript profile in relation to the normal cultivar Tucunaré.

## 1. INTRODUÇÃO

A soja é uma importante fonte de proteínas, para consumo humano e animal, e uma das mais importantes fontes de óleo para o consumo humano e produção do biodiesel. Essa cultura teve uma grande expansão na área cultivada nos últimos anos. Isso porque apresenta uma boa produtividade, podendo atingir acima de 3 toneladas por hectare, e um elevado conteúdo de reservas metabólicas em seus grãos, cerca de 20% de óleo e 40% de proteína.

O óleo de soja é composto essencialmente de triacilgliceróis, os quais são constituídos por três ácidos graxos, iguais ou diferentes, esterificados a uma molécula de glicerol. Os principais ácidos graxos encontrados no óleo de soja são: ácido palmítico (16:0) - 10%, ácido esteárico (18:0) - 3%, ácido oléico (18:1  $\Delta^9$ ) - 20%, ácido linoléico (18:2  $\Delta^{9,12}$ ) - 57% e ácido linolênico (18:3  $\Delta^{9,12,15}$ ) - 10%; podendo ser encontrados mutantes com concentrações alteradas desses compostos.

A composição de ácidos graxos influencia na estabilidade e determina o uso final do óleo. Óleo rico em ácido oléico é utilizado em frituras e saladas, enquanto aqueles com alto conteúdo em ácido linolênico são mais adequados para indústria de tintas e náilon em substituição ao óleo de linho. Óleos ricos em ácidos graxos polinsaturados são inadequados para uso em produtos comestíveis por causa de problemas relacionados à estabilidade oxidativa e, conseqüentemente, formação de *off-flavour*.

As elevadas concentrações de ácido linoléico e linolênico são os principais responsáveis pela alta instabilidade oxidativa, pois são mais suscetíveis às hidroperoxidações resultando em cetonas e aldeídos voláteis, que modificam as características físico-químicas do óleo e diminuem a sua qualidade. Assim, a tendência atual do mercado alimentício é buscar óleos com concentrações mais elevadas de ácidos graxos monoinsaturados e reduzida concentração de ácido linolênico.

A via de biossíntese de ácidos graxos em plantas envolve pelo menos dois compartimentos celulares, o plastídio e o retículo endoplasmático. A via plastidial é responsável pela biossíntese de ácidos graxos destinados a membranas celulares, enquanto que a via do retículo endoplasmático destina-se à biossíntese de ácidos graxos de armazenamento. Durante a biossíntese de ácidos graxos, as dessaturases introduzem duplas ligação em cadeias saturadas. A  $\omega$ -6-dessaturase converte ácido oléico em ácido

linoléico, enquanto que a  $\omega$ -3-dessaturase é responsável pela síntese de ácido linolênico a partir de ácido linoléico.

Estudos recentes têm identificado genes que codificam essas dessaturases. Em soja foram caracterizados dois genes principais que codificam as  $\omega$ -6-dessaturases do retículo endoplasmático, denominados *FAD2-1* e *FAD2-2*. Enquanto para a  $\omega$ -3-dessaturase foram identificados três genes principais, denominados *GmFAD3A*, *GmFAD3B* e *GmFAD3C*.

O Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja (PMQS) do BIOAGRO/UFV possui acessos com baixo conteúdo do ácido linolênico e alto conteúdo do ácido oléico. Entre esses, destacam-se a variedade FA22, que possui concentração média de ácido oléico (~50%), e os genótipos A29 e N85-2176, que possuem concentrações de ácido linolênico por volta de 1% e 3%, respectivamente. No entanto, esses cultivares apresentam características agronômicas pouco desejáveis, principalmente o baixo potencial produtivo. Dessa forma, espera-se que o cruzamento entre esses genótipos com cultivares elites possa originar novas variedades que atendam ao mercado que visa a obtenção de óleo com maior estabilidade oxidativa.

A seleção eficiente de genótipos de soja, com melhor qualidade do óleo, requer um melhor entendimento dos fatores genéticos que controlam o conteúdo de ácidos graxos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi estudar a regulação da biossíntese de ácidos graxos insaturados durante a ontogenia da semente de soja em genótipos contrastantes para os conteúdos de ácido oléico e linolênico.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA SOJA**

A soja constitui um dos produtos agrícolas de maior importância para o agronegócio brasileiro, ocupando lugar de destaque na pauta de exportação do país. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja. Na safra 2006/07, a cultura ocupou uma área de 20,7 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 58,4 milhões de toneladas. A produtividade média da soja brasileira é de 2.823 kg/ha, chegando a alcançar cerca de 3.000 kg/ha no estado de Mato Grosso, o maior produtor (EMBRAPA, 2008).

Dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior mostram que a soja tem uma importante participação nas exportações brasileiras. Em 2006, as comercializações movimentaram US\$ 9,3 bilhões, o que representou 6,77% do total exportado pelo país (EMBRAPA, 2008).

Cerca de 95% da produção nacional de soja destina-se à obtenção de óleo e farelo. O consumo de farelo, no Brasil, está restrito às indústrias de rações para animais e apenas uma pequena porcentagem da soja é processada e utilizada como ingredientes na alimentação humana, na forma de farinhas desengorduradas, flocos concentrados, isolados e extratos hidrossolúveis ou na forma de alimentos industrializados, como: tofu, carne de soja, leite de soja, sopas, molho, coberturas, bebidas, temperos e aromatizantes (MONTEIRO, 2003).

O óleo de soja é o líder mundial dos óleos vegetais em termos de produção e de consumo. O Brasil é o segundo maior exportador do mundo, ficando atrás apenas da Argentina. Um fato interessante é que, entre os quatro maiores exportadores, o Brasil é o que possui maior índice de crescimento médio anual, em torno de 13%. No ano de 2005, mais de 3 milhões de toneladas de óleo foram exportados pelo país (ABIOVE, 2008).

O óleo de soja é processado em três produtos básicos: óleo refinado comestível, óleo refinado para fins não alimentares e lecitina. O óleo refinado comestível é a matéria-prima para a produção de margarinas, gordura vegetal, óleo de cozinha, maionese e tempero de salada. O óleo refinado comestível também é utilizado na fabricação de produtos não comestíveis, como: esparadrapo, papel carbono, alguns medicamentos e explosivos. O óleo refinado para fins não alimentares é destinado à produção de velas, desinfetantes, sabões, vernizes, tintas, plásticos e lubrificantes,

enquanto a lecitina é muito utilizada em confeitos, sorvetes, alimentos que vão ao forno, produtos químicos, cosméticos e têxteis (COROL, 2008).

Além desses produtos básicos, recentemente o óleo de soja vem sendo utilizado para a produção de biodiesel. Essa nova vertente de mercado foi criada devido às mudanças climáticas associadas à liberação de gases resultantes da queima de combustíveis fósseis, ao alto preço internacional do petróleo e à preocupação com o desenvolvimento sustentável (SCHUCHARDT, 2001).

Atualmente a União Européia é o maior produtor de biodiesel com valores de produção estimados em 1,5 milhões de toneladas anuais. Segundo a Comissão Européia, em 2003, a Alemanha produziu cerca de 715 mil toneladas, a França 357 mil toneladas e a Itália 273 mil toneladas (BOZBAS, 2008).

Em 2004, foi lançado o Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel (PNPB) pelo Governo Federal Brasileiro que prevê a adição de biodiesel ao diesel convencional. No ano de 2005, a lei 11.097/05 estabeleceu percentuais mínimos de mistura de biodiesel ao diesel, e o monitoramento da inserção do novo combustível no mercado. Por essa lei será obrigatória a adição de 2% de biodiesel (biodiesel B2) até 2008, o que corresponde a uma demanda de 800 milhões de litros, e misturas de 5 a 20% (biodiesel B5-B20) até 2013. Hoje, a produção de biodiesel alcança o volume de 870 milhões de litros/ano, o que já supera a meta para a utilização do B2. A meta para o ano de 2013 é de 2,40 bilhões de litros/ano (PORTAL DO BIODIESEL, 2008).

Várias culturas, como: colza, nabo-forrageiro, dendê (palma), girassol, babaçu, amendoim e pinhão manso, podem ser utilizadas como matéria prima para a produção de biodiesel. No entanto, 85% do biodiesel produzido no Brasil tem a soja como matéria-prima e estima-se que nos próximos 10 anos essa cultura ainda permanecerá como a principal fonte de biodiesel (PORTAL DO BIODIESEL, 2008).

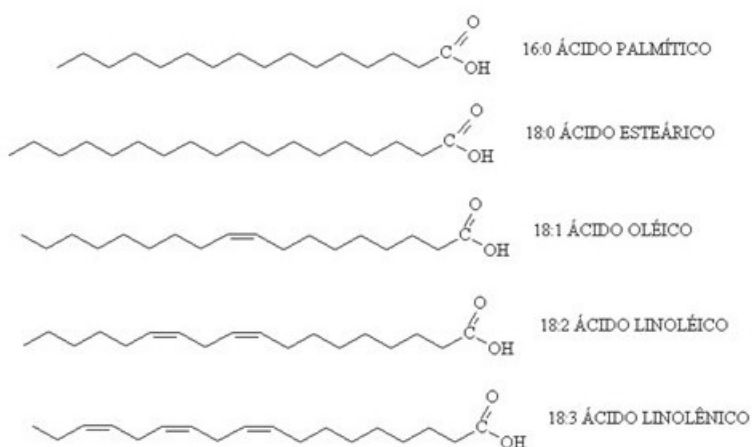
## **2.2. QUALIDADE DO ÓLEO**

O óleo de soja é composto essencialmente de triacilgliceróis, os quais são constituídos por uma molécula de glicerol esterificada a três ácidos graxos, que variam no tamanho, de 12 a 24 átomos de carbono, e no grau de insaturação. A composição média é centrada em cinco ácidos graxos principais: palmítico (16:0), esteárico (18:0), oléico (18:1  $\Delta^9$ ), linoléico (18:2  $\Delta^{9,12}$ ) e linolênico (18:3  $\Delta^{9,12,15}$ ) (Tabela 1 e Figura 1). Estes ácidos graxos compõem mais de 95% do conteúdo de ácidos graxos do óleo e tal

característica é relativamente constante para a grande maioria dos óleos comerciais disponíveis no mercado (COSTA NETO, 2000).

**Tabela 1-** Composição média de ácidos graxos do óleo de soja comercial.

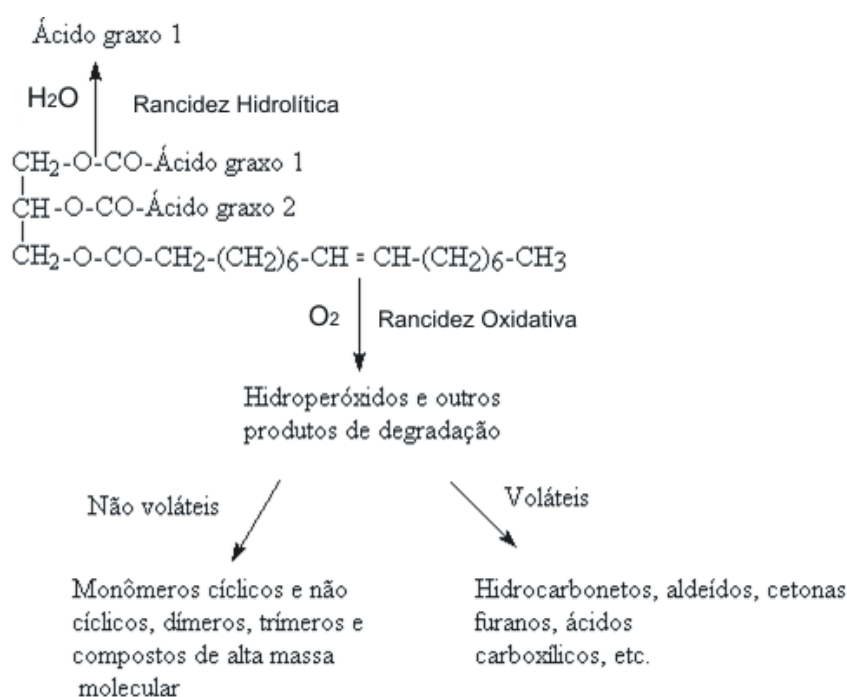
Nº de carbonos	Ácidos graxos	Concentração (%)
12:0	Láurico	0,1 (máx.)
14:0	Mirístico	0,2 (máx.)
16:0	Palmítico	9,9 - 12,2
16:1 $\Delta^9$	Palmitoléico	0,2 (máx.)
18:0	Estearico	3 - 5,4
18:1 $\Delta^9$	Oléico	17,7 - 26
18:2 $\Delta^{9,12}$	Linoléico	49,7 - 56,9
18:3 $\Delta^{9,12,15}$	Linolênico	5,5 - 9,5
20:0	Araquídico	0,2 - 0,5
20:1 $\Delta^5$	Gadolêico	0,1 - 0,3
22:0	Behênico	0,3 - 0,7
24:0	Lignocérico	0,4 (máx.)



**Figura 1:** Estrutura dos cinco principais ácidos graxos encontrados na soja.

A composição e distribuição dos ácidos graxos na molécula de triacilglicerol determinam a qualidade do óleo, influenciando o seu valor nutricional, sabor, odor e propriedades físicas, como o ponto de fusão e estabilidade oxidativa (YADAV, 1996).

Os óleos e gorduras, utilizados repetidamente em fritura por imersão, sofrem degradação por reações tanto hidrolíticas quanto oxidativas (Figura 2). Neste caso, a oxidação, que é acelerada pela alta temperatura do processo, é a principal responsável pela modificação das características físico-químicas e organolépticas do óleo. O óleo torna-se escuro, viscoso, tem sua acidez aumentada e desenvolve odor desagradável, comumente chamado de ranço (COSTA NETO, 2000).



**Figura 2:** Tipos de degradação em óleos usados em frituras. Adaptado de COSTA NETO (2000)

O alto conteúdo de ácidos graxos polinsaturados é responsável pela redução da estabilidade à oxidação e da qualidade (sabor e odor) do óleo de soja. Os ácidos linoléico e linolênico destacam-se como os mais suscetíveis à degradação oxidativa enzimática e não enzimática (ANDERSON & BAKER, 1983). A hidroperoxidação dos ácidos graxos polinsaturados pela ação de lipoxigenases leva à produção dos 9 e 13 hidroperóxidos dos ácidos graxos, que por reações subseqüentes produzem aldeídos e cetonas de cadeia curta (GERMAN & KINSELLA, 1985).

A hidrogenação química é um processamento industrial normalmente utilizado para aumentar a estabilidade oxidativa do óleo, reduzindo substancialmente o conteúdo de ácidos graxos polinsaturados. No entanto, a reação leva à formação de isômeros trans, como o ácido trans-oléico, que têm sido apontados como responsáveis pelo aumento de arteriosclerose, doenças coronárias, e de alguns casos de câncer em humanos (ALONSO & MAROTO, 2000; HU, 1997).

O óleo de soja não hidrogenado ainda não foi cuidadosamente estudado em relação às doenças humanas, porém, o seu consumo foi associado à redução do câncer de mama (DAI, 2002). Assim, a produção de óleo de soja estável oxidativamente, sem hidrogenação, é da maior importância.

### **2.3. BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS**

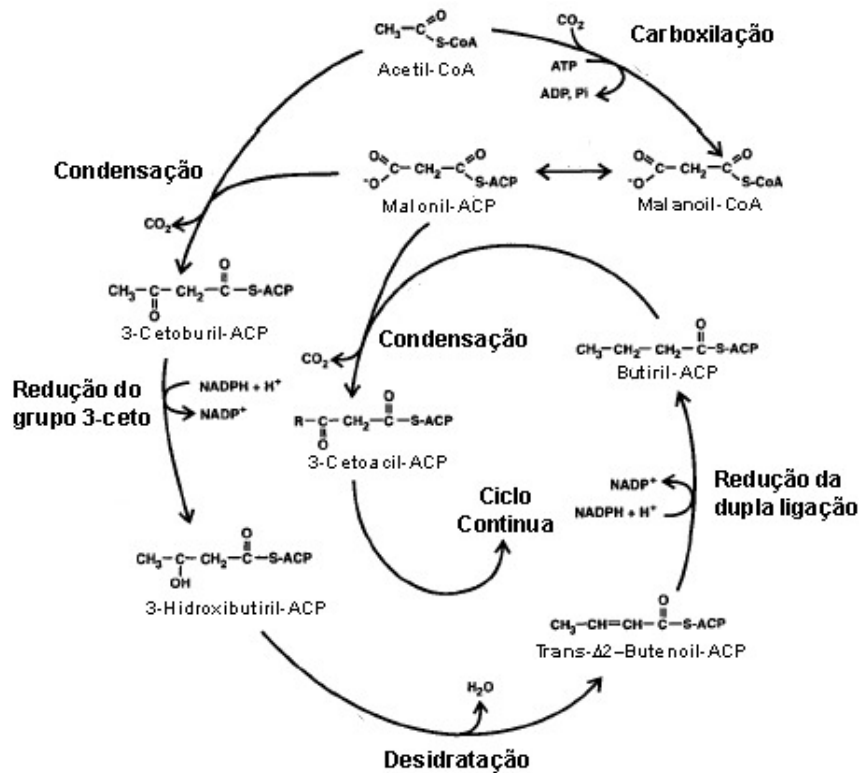
A síntese de ácidos graxos é a principal via metabólica, essencial para a função de todas as células vegetais. Seus produtos servem como principais constituintes das membranas celulares e em células especializadas, os ácidos graxos ou seus derivados, podem agir como moléculas de sinalização e como armazenamento de carbono e energia (OHLROGGE, 1995).

A biossíntese de lipídeos em vegetais superiores ocorre durante o desenvolvimento da semente, envolvendo o retículo endoplasmático e os plastídios. Desta forma, as plantas possuem mecanismos específicos de exportação de lipídeos para diferentes compartimentos celulares ao contrário de outros organismos (OHLROGGE, 1995).

A semente em desenvolvimento está unida à placenta da vagem pelo funículo e, através do extremo chalazal do hilo, penetram os vasos condutores que levam a seiva às estruturas anatômicas. O período entre a fertilização da oosfera e à manutenção fisiológica caracteriza-se por um estágio inicial de rápidas divisões celulares nos cotilédones, que se completam em cerca de 15 dias após a fertilização. Nos próximos 45 dias, ocorrem rápidos alongamentos celulares, elevada atividade biossintética e um rápido incremento do peso seco da semente. Aproximadamente 50% do total de glicerolipídeos na semente madura são sintetizados entre 30 e 45 dias após a fertilização, ocorrendo rápida proliferação de vacúolos com óleo (MOORE, 1993).

A produção de ácidos graxos de 16 e 18 carbonos requer cerca de 30 enzimas, sendo que o precursor para a biossíntese, o “pool” de acetil-CoA, é encontrado nos

plastídios. As reações de biossíntese de ácidos graxos saturados são mostradas na Figura 3 (OHLROGGE, 1995).



**Figura 3:** Reações de biossíntese de ácidos graxos saturados. Adaptado de OHLROGGE (1995).

Inicialmente a enzima acetil-CoA carboxilase converte acetil-CoA e  $\text{CO}_2$  a malonil-CoA, em uma reação dependente de ATP. O malonil-CoA produzido pela ação da acetil-CoA carboxilase é transferido para a proteína carreadora de grupos acil (ACP). A partir dessa etapa, todas as reações subsequentes envolvem a via ACP até a produção de ácidos graxos de 16 ou 18 carbonos que serão esterificados ou exportados pelo plastídio (OHLROGGE, 1995).

Após transferência ao ACP, o malonil-ACP participa de uma reação de condensação com o acetil-CoA, resultando na formação de uma ligação carbono-carbono e liberação do  $\text{CO}_2$ , tornando a reação essencialmente irreversível. Pelo menos três enzimas de condensação separadas são necessárias durante o processo de formação de um ácido graxo de 18 carbonos (OHLROGGE, 1995).

A primeira condensação de acetil-CoA e malonil-ACP para formar um produto de quatro carbonos é catalisada pela 3-cetoacil-ACP sintase III (KASIII). A segunda

enzima de condensação, KASI, é responsável pela elongação da cadeia de 6 até 16 carbonos. Por fim a condensação do palmitoil-ACP a esteroil-ACP é catalisada pela KASII (JAWORSKI, 1989).

Três reações adicionais ocorrem após cada condensação para a formação de um ácido graxo saturado. O grupo carbonil do 3-cetoacil-ACP é reduzido pela enzima 3-cetoacil-ACP redutase, que utiliza NADPH como doador do elétron. A reação seguinte é a desidratação pela hidroxiaçil-ACP desidratase. O ciclo termina com a enoil-ACP redutase, que utiliza NADH ou o NADPH para reduzir ligações duplas em posição trans, formando um ácido graxo saturado. A ação combinada destas quatro reações promove o alongamento do precursor de ácido graxo em dois carbonos por ciclo. Ainda no plastídio, pode ocorrer a introdução de uma dupla ligação catalisada pela enzima solúvel esteroil-ACP dessaturase (OHLROGGE, 1995).

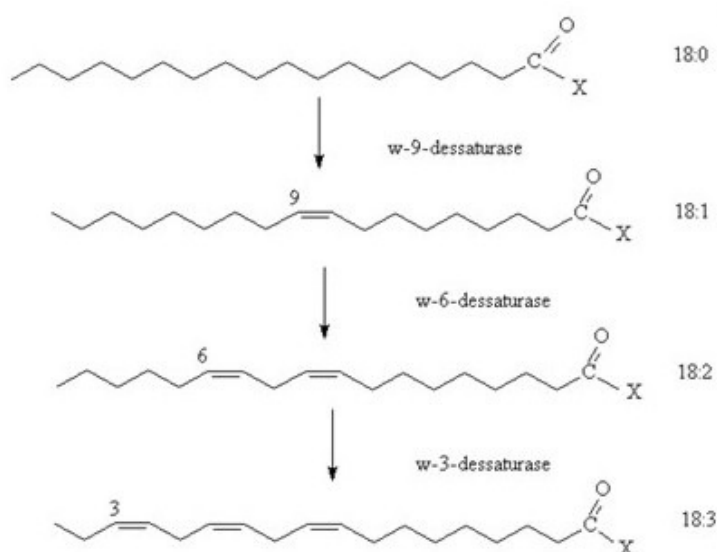
A elongação dos ácidos graxos no plastídio é finalizada quando o grupo do acil é removido do ACP, o que pode acontecer de duas maneiras. Na maioria dos casos ocorre hidrólise da ligação tioéster do acil-ACP, liberando o ácido graxo. Alternativamente, a aciltransferases plastidial transfere o ácido graxo do ACP para o glicerol-3-fosfato ou ao monoacilglicerol-3-fosfato (OHLROGGE, 1995).

No retículo endoplasmático ocorre a via de biossíntese de triacilgliceróis (TAG), na qual os ácidos graxos são transferidos seqüencialmente da coenzima-A para as posições 1 e 2 do glicerol-3-fosfato, resultando no metabólito central, o ácido fosfatídico (PA). A desfosforilação do ácido fosfatídico libera o diacilglicerol (DAG). Na etapa final da síntese do TAG, um terceiro ácido graxo é transferido à posição 3 do DAG, catalisada pela diacilglicerol aciltransferase (DAGAT) (OHLROGGE, 1995).

Na semente madura, o TAG é armazenado nos oleossomos, corpos densos, aproximadamente esféricos, com diâmetro médio de 1  $\mu\text{m}$  (HUANG, 1992; MURPHY, 1993), que não alteram o tamanho durante o desenvolvimento da semente. O acúmulo de lipídeos é acompanhado pelo aumento do número de corpos lipídicos. Esta organela parece ser delimitada por uma monocamada composta de fosfolipídeos e pela proteína oleosina. Entretanto, estes constituintes representam menos de 5% em peso da fração óleo (OHLROGGE, 1995).

## 2.4. DESSATURASES E BIOCÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS

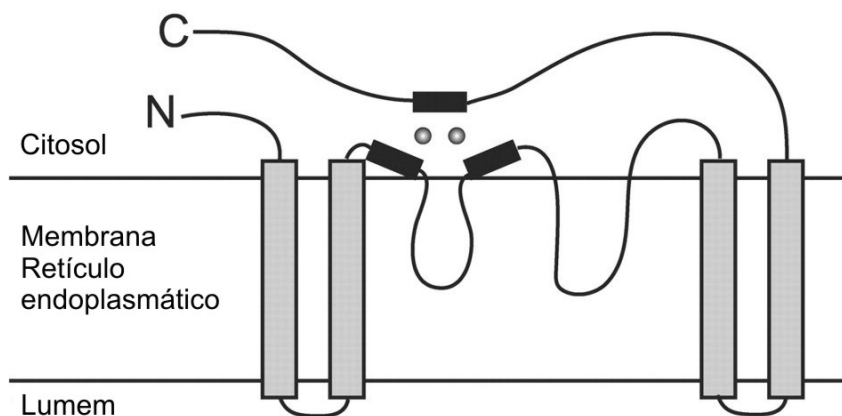
As ácido graxo dessaturases são responsáveis pela produção de ácidos graxos insaturados e polinsaturados. Cada dessaturase catalisa a introdução de uma dupla ligação em uma posição específica na cadeia acil do ácido graxo (LOS & MURATA, 1998). A enzima é nomeada de acordo com a posição em que a dupla ligação é adicionada, podendo ser de duas formas: a partir da extremidade carboxi-terminal até a posição da dupla ligação, recebendo o símbolo  $\Delta$ ; e a partir da extremidade metila até a posição da insaturação, recebendo o símbolo  $\omega$ . As principais dessaturases e suas reações são mostradas na Figura 4.



**Figura 4:** Principais dessaturases envolvidas na biossíntese de ácidos graxos insaturados e polinsaturados. “X” representa um grupo ao qual o ácido graxo encontra-se ligado, 18:0 representa ácido esteárico, 18:1 ácido oléico, 18:2 ácido linoléico e 18:3 ácido linolênico. A numeração foi realizada a partir da extremidade metila.

As dessaturases são classificadas em duas grandes classes, as solúveis e as ligadas à membrana do retículo endoplasmático. Dessaturases solúveis representam um grupo pequeno de enzimas que possuem dois motivos conservados de histidina e ferro (SHANKLIN & CAHOON, 1998). Elas adicionam uma dupla ligação em ácidos graxos ligados à proteína carreadora de grupos acil (ACP). A proteína mais importante desse grupo é a  $\Delta$ -9-estearoil-ACP dessaturase ( $\omega$ -9-dessaturase) (DYER, 2002).

As dessaturases de membranas possuem quatro domínios transmembrana e três regiões ricas em histidina ligadas coordenadamente a dois átomos de ferro (Figura 5). Essas enzimas produzem duplas ligações em ácidos graxos que estão esterificados com a coenzima A ou a fosfatidil colina (DYER, 2002).

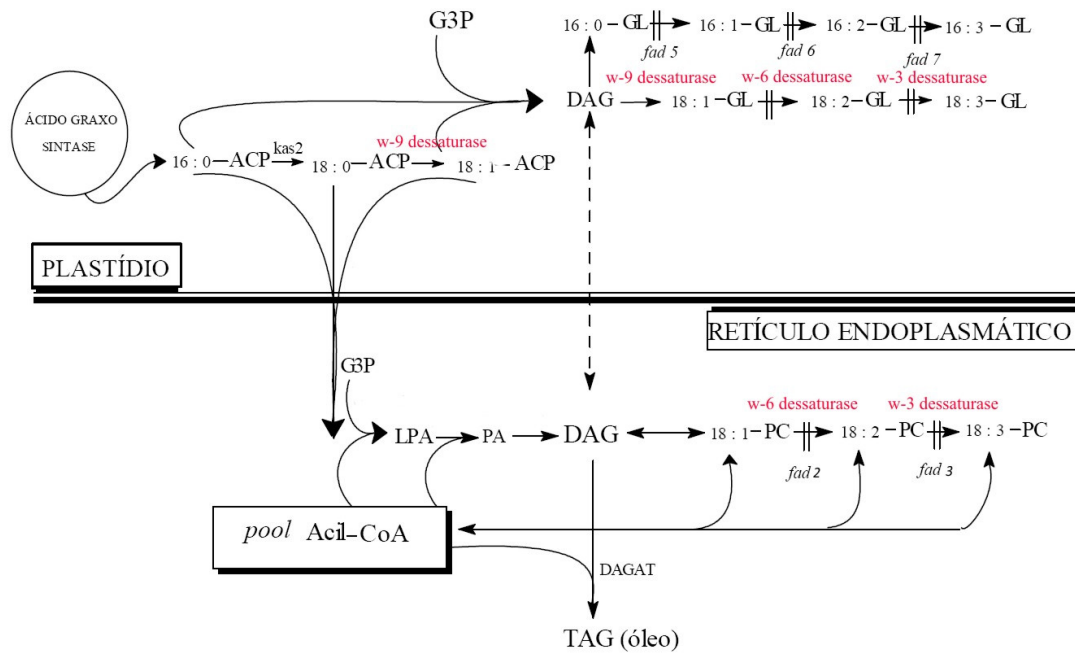


**Figura 5:** Modelo topológico das dessaturases de membrana mostrando os seus quatro domínios transmembrana (retângulos em cinza), suas três regiões ricas em histidina (retângulos em preto) e os dois átomos de ferro (círculos em cinza). Modificado de DYER (2002).

As análises das seqüências de resíduos de aminoácidos das dessaturases podem levar a dedução de suas relações filogenéticas. ALONSO (2003) comparou várias dessaturases de membrana em diferentes organismos e observou que todas as proteínas apresentaram três motivos ricos em histidina altamente conservados, sugerindo uma origem comum. Foram identificados também, três grupos distintos de dessaturases: o grupo das  $\omega$ -9-dessaturases, o segundo grupo que inclui a  $\omega$ -3-dessaturases, e o terceiro que compreende as chamadas "front end" dessaturases, representadas pelas  $\Delta$ -5,  $\Delta$ -6 e  $\Delta$ -8 dessaturases.

Com base em dados funcionais das  $\omega$ -9-dessaturases, o gene é considerado como o ancestral dos genes das dessaturase de membrana. O arranjo do grupo das  $\omega$ -3-dessaturases sugere que elas tenham se originado de genes de uma linhagem de  $\omega$ -6-dessaturase procariota. No grupo das "front end" dessaturases, dados filogenéticos e funcionais indicam que os genes das  $\Delta$ -5-dessaturases originaram independente em diferentes linhagens evolucionárias a partir de um ancestral da  $\Delta$ -6-dessaturase. Além disso, as  $\Delta$ -8-dessaturases parecem ter evoluído de uma só vez nas plantas a partir de um gene de  $\Delta$ -6-dessaturase (ALONSO, 2003).

As dessaturase de plantas atuam em duas vias para a produção de ácidos graxos insaturados, a via plastidial e a via do retículo endoplasmático (Figura 6). Tanto uma quanto outra ocorrem nos tecidos foliares com troca significativa entre seus intermediários. No entanto, a via do retículo endoplasmático predomina durante a biossíntese de óleo no desenvolvimento de sementes e em outros tecidos não verdes (YADAV, 1996).



**Figura 6:** Vias de produção de ácidos graxos polinsaturados em plantas superiores. Em vermelho estão destacadas as principais dessaturases responsáveis pela produção de ácidos graxos insaturados. Modificado de YADAV (1996).

As duas vias são dependentes de O<sub>2</sub>, mas apresentam algumas particularidades. No retículo endoplasmático o doador de elétrons para as dessaturases é o citocromo b5, enquanto no plastídio é a ferredoxina. Outra diferença encontrada refere-se ao substrato primário, que no retículo endoplasmático é a fosfatidil colina (PC) e no plastídeos são os galactolípídeos (GL), especialmente os monogalactosil diacilglicerol e digalactosil diacilglicerol (YADAV, 1996).

Em *Arabidopsis*, foram identificadas sete classes de mutantes, cada uma com deficiência a determinadas dessaturases. Os mutantes serviram de base para determinação das funções das proteínas. Mutações em dois genes, *fad2* e *fad3*, influenciam principalmente a biossíntese de lipídeos insaturados extra-cloroplastídicos, enquanto que mutações nos outros cinco genes, *fad4*, *fad5*, *fad6*, *fad7* e *fad8*, afetam os

ácidos graxos sintetizados no cloroplasto. Os genes *fad3*, *fad7* e *fad8* foram caracterizados como responsáveis pela produção  $\omega$ -3-dessaturase, enquanto que os lócus *fad2* e *fad6* para a  $\omega$ -6-desaturase (WALLIS & BROWSE, 2002).

Duas das cinco dessaturases cloroplastidiais possuem alta especificidade pelo substrato. O gene *fad4* codifica para uma  $\Delta$ -3-desaturase que insere uma ligação dupla trans no ácido esteárico (18:0) esterificado na posição Sn-2 no fosfatidilglicerol. Já o produto do gene *fad5* é responsável pela síntese de 16:1  $\Delta^7$  sobre o monogalactosildiacylglicerol e possivelmente no digalactosildiacylglicerol (MIQUEL & BROWSE, 1992; BROWSE, 1993).

As outras dessaturases cloroplastidiais atuam com pouca especificidade em relação ao tamanho dos ácidos graxos (16 ou 18 carbonos) e ao seu ponto de ligação com o glicerol (Sn-1 ou Sn-2). O gene *fad6* codifica para uma 16:1/18:1 dessaturase, enquanto que os genes *fad7* e *fad8* codificam duas isoenzimas distintas com ambas as funções de 16:2/18:2 dessaturase (BROWSE, 1989; MCCONN, 1994).

Nas retículo endoplasmático são encontradas atividades alternativas para algumas dessaturases. Em mamona (*Ricinus communis*),  $\omega$ -6-dessaturases convertem oleato a (R)-12-hidroxiestearato. Em *Lesquerellas* essas enzimas possuem um sistema bifuncional produzindo uma mistura de 12-hidroxiestearato e um produto 12-monoenólico (VAN DE LOO, 1995).

As atividades de 12-hidroxilação e 12-dessaturação estão intimamente ligadas. Dessa forma, sugere-se que ambas as reações enzimáticas sejam realizadas no mesmo sítio ativo (BUIST & BEHROUZIAN, 1998; BEHROUZIAN, 2001). Estudos evidenciam que os resíduos de aminoácidos 148 e 324 dessas dessaturases desempenham um papel essencial na determinação da taxa de desidrogenação versus hidroxilação em *Arabidopsis* (BROADWATER, 2002). Mutagênese sítio dirigida, envolvendo apenas quatro resíduos de aminoácidos, foi suficiente para alterar o produto formado em reações envolvendo  $\omega$ -6 dessaturases (BROUN, 1998).

A compreensão do nível de regulação das dessaturases no metabolismo de ácidos graxos é pouco desenvolvida (OHLROGGE, 1995). A regulação dessa via biossintética pode ser dada em vários níveis: diretamente na sua transcrição (controle transcricional); no *splicing* do RNA, transporte do RNA para o citoplasma e degradação do RNA (controles pós-transcricional); na tradução (controle traducional); e na atividade enzimática (controle pós-traducional). No geral, os mecanismos de regulação mais comuns ocorrem em nível de transcrição e atividade enzimática.

A atividade enzimática de dessaturases *in vitro* é complexa, uma vez que essas enzimas encontram-se ancoradas na membrana do retículo endoplasmático, o que dificulta a sua purificação. Além disso, esses ensaios requerem compostos radioativos para a quantificação da atividade. Uma alternativa para estimar a atividade relativa das dessaturases é por meio de cálculos a partir dos dados de conteúdos médios dos ácidos graxos polinsaturados (WILSON, 2004).

A regulação da transcrição pode se analisada pelo perfil de acúmulo de transcrito. Alguns genes que codificam para as principais  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 dessaturases em soja tiveram suas seqüências depositadas em bancos de dados recentemente. HEPPARD (1996) descreveu a existência de dois genes para  $\omega$ -6-dessaturases do retículo endoplasmático em soja, *FAD2-1* e *FAD2-2*. O gene *FAD2-1* é altamente expresso em sementes em desenvolvimento, codificando a  $\omega$ -6-dessaturase que sintetiza ácidos graxos de armazenamento em sementes. Já o gene *FAD2-2* é expresso constitutivamente em todos os órgãos e provavelmente codifica a  $\omega$ -6-dessaturase responsável pela produção de ácidos graxos de membrana.

BILYEU (2003) identificou e caracterizou três genes independentes que contribuem para o conteúdo de ácido linolênico em sementes de soja, *GmFAD3A*, *GmFAD3B* e *GmFAD3C*. Os genes *GmFAD3A* e *GmFAD3B* possuem 94% de identidade na seqüência das regiões codificadoras, no entanto, os níveis de transcritos são distintos nos diferentes estádios de desenvolvimento e tecidos de soja. O *GmFAD3A* é altamente expresso em sementes, enquanto *GmFAD3B* e *GmFAD3C* apresentaram níveis de transcritos relativamente baixos nesse órgão.

Diversos genótipos de soja com conteúdos diferenciados dos ácidos graxos tem sido desenvolvidos. A29, N85-2176 e FA22 apresentam genes de grande interesse no melhoramento genético da soja, especificamente para o aumento da estabilidade oxidativa do óleo. A29 e N85-2176 possuem baixíssimas concentrações de ácido linolênico na semente madura (1% e 3%, respectivamente), enquanto que FA22 possui alta concentração de ácido oléico (cerca de 50%). O entendimento do controle genético da regulação da via de biossíntese de ácidos graxos polinsaturados, poderá tornar o processo de seleção mais eficiente em populações segregantes derivadas do cruzamento entre essas variedades e cultivares elite. Espera-se identificar os genes de efeito maior e futuramente desenhar marcadores moleculares específicos para os alelos mutantes que levam a redução da atividade enzimática das dessaturases.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

O Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja (PMQS) do BIOAGRO/UFV vem desenvolvendo linhagens de soja especiais para a agroindústria, dentre as quais estão linhagens com baixos conteúdos de ácidos linoléico e linolênico. Nesse contexto, a principal meta deste programa é aumentar a estabilidade oxidativa do óleo pela redução do conteúdo de ácido linolênico e pelo aumento do conteúdo do ácido oléico. O presente trabalho está inserido no PMQS e tem como objetivo geral o estudo da regulação da biossíntese de ácidos graxos polinsaturados durante a ontogenia da semente de soja em genótipos contrastantes para os conteúdos de ácido oléico e linolênico.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as concentrações dos ácidos graxos durante a ontogenia da semente de soja;
  
- Estimar a atividade enzimática relativa da  $\omega$ -6-dessaturase e da  $\omega$ -3-dessaturases com base nas concentrações médias de ácidos graxos;
  
- Avaliar o acúmulo de transcritos dos genes que codificam para as principais dessaturase do retículo endoplasmático, *FAD2-1* e *FAD2-2* que codificam as  $\omega$ -6-dessaturases e dos genes *GmFAD3A*, *GmFAD3B* e *GmFAD3C*, que codificam as  $\omega$ -3-dessaturases, em diferentes genótipos durante a ontogenia da semente de soja .

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL GENÉTICO

Foram utilizados quatro genótipos de soja: A29, FA22, N85-2176 e Tucunaré. A29 e FA22 foram desenvolvidos por pesquisadores da Universidade Estadual de Iowa (EUA). A29 foi desenvolvida pela combinação das linhagens A5 e A23, apresenta o genótipo *fan(A5)fan(A5)fan2(A23)fan2(A23)fan3fan3* e possui apenas 1% de ácido linolênico (ROSS, 2000). As linhagens A5 e A23 foram selecionadas para baixo conteúdo de ácido linolênico por programas que utilizam mutagênicos químicos. Os genes responsáveis pela redução do conteúdo de ácido linolênico na semente nessas duas linhagens foram denominados *fan(A5)* e *fan2(A23)* (RENNIE & TANNER, 1991; FEHR, 1992). O genótipo FA22 foi selecionado em uma população de melhoramento com reduzido ácido linoléico e possui elevado conteúdo de ácido oléico, aproximadamente 50%. O genótipo N85-2176 foi selecionado por BURTON (1989) a partir do cruzamento de N78-2245 vs. PI-123440, ambas com baixos conteúdos de ácido linolênico. A variedade Tucunaré foi desenvolvida pela Fundação Matogrosso, e possui cerca de 19% de ácido oléico e 8% de ácido linolênico. Essa variedade é amplamente cultivada no Brasil, apresentando boa produtividade e resistência ao nematóide de cistos da soja (NCS) raças 1 e 3.

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa no período de novembro de 2006 a fevereiro de 2007. A temperatura e umidade foram monitoradas tendo valores médios de temperatura máxima de 34,14°C e mínima de 22,93°C; e valores médios de umidade máxima de 91,16% e mínima de 45,58%. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 30 vasos por genótipo. As sementes foram plantadas em vasos de três litros contendo solo previamente adubado, cultivando-se três plantas por vaso.

As sementes de cada genótipo foram coletadas e congeladas separadamente em nitrogênio líquido, de acordo com o seu peso úmido:

- 1° estágio: 0 a 125 mg;
- 2° estágio: 126 a 250 mg;
- 3° estágio: 251 a 375 mg;
- 4° estágio: superior a 376 mg;
- 5° estágio: Semente madura.

As sementes foram mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  e após a separação nos cinco estádios, foram liofilizadas e utilizadas em análises posteriores.

#### **4.2. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS ÁCIDOS GRAXOS**

A concentração dos ácidos graxos na fração óleo das sementes nos cinco estádios de desenvolvimento foram determinados por cromatografia gasosa. Foram feitas três extrações individuais e independentes para cada amostra, sendo as análises realizadas em duplicata. Para compor cada amostra foram tomadas ao acaso de 7 a 10 sementes de cada estágio de desenvolvimento/genótipo. No preparo da amostra, as sementes foram pulverizadas, na presença de nitrogênio líquido, em gral e pistilo. A cada amostra de 100 mg foi adicionado 1 mL de hexano, sendo este adicionado rapidamente a fim de que a amostra não adsorvesse água. A mistura foi mantida por aproximadamente 16 h no escuro a  $4^{\circ}\text{C}$ , sob atmosfera de  $\text{N}_2$ . Após esse tempo, a solução de lipídeos em hexano foi transferida para outro tubo e evaporada por borbulhamento de  $\text{N}_2$ . Para obtenção dos ésteres metílicos, foi utilizada a metodologia descrita por JHAM (1982), com algumas modificações. Foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de uma solução de metóxido de sódio 1M e a mistura mantida em banho-maria a  $30^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. A seguir, foi adicionado 1 mL de água deionizada e 1,5 mL de hexano, sendo a mistura novamente agitada em vórtex e mantida por 1 hora no escuro. Após este período, cerca de 750  $\mu\text{L}$  da fase orgânica contendo os metil-ésteres foram coletados e transferidos para outro tubo, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, ao qual foi adicionado cerca de 1 mg de sulfato de sódio anidro.

Após a derivatização, alíquotas de 1  $\mu\text{L}$  foram injetadas em cromatógrafo a gás GC-17A, equipado com auto-injetor AOC-17 e integrador C-R7A, marca SHIMADZU. Foi utilizada uma coluna carbowax (30m x 0,32 mm) contendo polietilenoglicol como fase estacionária. As temperaturas utilizadas nas análises foram de  $225^{\circ}\text{C}$  para a coluna,  $245^{\circ}\text{C}$  para injetor e  $280^{\circ}\text{C}$  para o detector. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio, com um fluxo de 1,1 mL/min.

#### **4.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO TOTAL**

Para a análise da concentração de óleo total foram utilizadas apenas as sementes fisiologicamente maduras. A determinação foi realizada em aparelho extrator de Soxhlet, utilizando-se éter de petróleo como solvente, segundo o procedimento descrito

em Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985), com refluxo por 10 horas.

#### **4.4. ATIVIDADE RELATIVA DAS DESSATURASES**

A atividade relativa das dessaturases foi determinada com base nas concentrações médias dos ácidos graxos insaturados, método descrito por WILSON (2004). As atividades relativas estimadas da  $\omega$ -6-dessaturase e  $\omega$ -3-dessaturases foram calculadas pelas fórmulas abaixo:

$$\text{Atividade de } \omega\text{-6-dessaturase} = \%[(18:2+18:3)/(18:1+18:2+18:3)] \times 100$$

$$\text{Atividade de } \omega\text{-3-dessaturase} = \%[(18:3)/(18:2+18:3)] \times 100$$

Onde:

18:1 = Concentração média de ácido oléico;

18:2 = Concentração média de ácido linoléico;

18:3 = Concentração média de ácido linolênico.

#### **4.5. ANÁLISE DO ACÚMULO DE TRANSCRITO POR PCR EM TEMPO REAL**

##### **4.5.1. Extração de RNA total de sementes de soja**

A extração de RNA total de sementes de soja foi realizada com o reagente *Trizol* (INVITROGEN), como descrito a seguir. Todas as etapas de extração foram realizadas a 4°C e em condições livres de ribonucleases.

As análises foram executadas nas quatro variedades e nos quatro primeiros estádios, constituindo de duas extrações individuais e independentes para cada genótipo/estádio. Para compor cada amostra foram tomadas ao acaso de 7 a 10 sementes de cada estágio de desenvolvimento/genótipo. Amostras de aproximadamente 100 mg foram pulverizadas, na presença de nitrogênio líquido, em gral e pistilo. O pó foi transferido para microtubos e rapidamente foi adicionado 1 mL do reagente *Trizol*. As amostras foram agitadas em vórtex por 1 min. Após incubação por 5 min no gelo, foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio. As amostras foram agitadas em vórtex novamente por 15 s e submetidas a centrifugação a 13.000 xg, por 15 min a 4°C. A fase superior foi transferida para um novo microtubo e submetida à precipitação com 400  $\mu$ L de

isopropanol gelado por 2 h a -20°C. A seguir, foi centrifugada a 13.000 xg por 20 min a 4°C, o precipitado resultante foi lavado duas vezes com 200 µL de etanol 70% e seco à temperatura ambiente. Cada amostra foi ressuspensa em 20 µL de água previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro a 260 nm. A qualidade do RNA foi avaliada pela integridade das bandas do RNA ribossômico em gel de agarose 1,5%. A pureza foi determinada pela razão das absorvâncias nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm.

Por fim, o RNA total foi tratado com DNase RNase Free (PROMEGA) para eliminação de DNA contaminante. Amostras de 10 µg RNA foram tratadas com 5 unidades de DNase por 45 min a 37°C. A purificação foi realizada pelo método do fenol-clorofórmio. O RNA foi extraído com 100 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1). As amostras foram agitadas em vórtex por 1 min e centrifugada a 13.000 xg por 2 min, a 4°C. A fase superior foi transferida para um novo microtubo e submetida à precipitação com 250 µL de etanol gelado e 30 µL de acetato de sódio 3 M, por 30 min a -20°C. A seguir, foi centrifugada a 13.000xg por 5 min a 4°C, o precipitado resultante foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70% e seco à temperatura ambiente. Cada amostra foi ressuspensa em 20 µL de água previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). As amostras foram novamente quantificadas e avaliadas quanto a integridade, como descrito anteriormente.

#### **4.5.2. Síntese de cDNA**

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando o kit *SuperScript™ First-Strand Synthesis System* (INVITROGEN), de acordo com as recomendações do fabricante. Amostras de RNA total (1 µg) dos diferentes estádios de desenvolvimento/genótipo foram incubadas com 1 µL de oligo (dT)<sub>12-18</sub>, a 70°C por 10 min e, em seguida, incubadas no gelo. A seguir foi adicionado tampão de PCR 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl<sub>2</sub> 5 mM, os quatro dNTPs (0,5 mM de cada) e DTT 5 mM, e as amostras incubadas a 42°C por 5 min. Em seguida, foram adicionados 200 U da enzima transcriptase reversa e as amostras foram incubadas a 42°C por 50 min e a 70°C por 15 min. Para cada amostra foi feito um controle negativo contendo todos os reagentes, com exceção da transcriptase reversa.

A verificação de possível contaminação com DNA genômico foi realizada pela amplificação com *primer* de actina de soja (*Forward* 5' CCC CTC AAC CCA AAG

GTC AAC AG 3' e *Reverse* 5' GGA ATC TCT CTG CCC CAA TTG TG 3'). Cada reação de amplificação de 25 µL foi constituída de 1 µL de cDNA; Tris-HCl 10 mM pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,2 mM de cada um dos desoxirribose nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 0,8 µM de *primers* e 1 U de Taq DNA polimerase.

Os ciclos de amplificação da reação de PCR foram constituídos por uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 min, seguidos de 35 ciclos constituídos por: uma segunda etapa de desnaturação a 94°C por 1 min, uma etapa de ligação dos *primers* ao cDNA molde a 56°C por 1 min e 30 s e uma etapa de extensão a 72°C por 2 min. Após o 35º ciclo foi realizado um passo final de extensão a 72°C por 7 min.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TBE 1X contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo, e visualizados em transiluminador e fotodocumentado.

#### 4.5.3. Confeção dos *primers* para PCR em tempo real

A análise dos níveis de transcritos foi realizada utilizando-se a metodologia de PCR quantitativo. Os oligonucleotídeos específicos foram desenhados a partir das seqüências de nucleotídeos dos cDNAs totais correspondentes aos genes que codificam a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e as principais ω-6-dessaturases e ω-3-dessaturases de membrana do retículo endoplasmático de soja. Essas seqüências estão disponíveis no banco de dados público *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information – NCBI*) e possuem os seguintes números de acesso: DQ192668 (*GAPDH*); L43920 (*FAD2-1*); L43921 (*FAD2-2*); AY204710 (*GmFAD3A*); AY204711 (*GmFAD3B*) e AY204712 (*GmFAD3C*).

O programa utilizado para o desenho dos oligonucleotídeos foi o *Primer3 Input Program* (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Os *primers* desenhados foram alinhados utilizando o programa VECTOR NTI® com as seqüências de maior similaridade para verificar a viabilidade de discriminação.

#### 4.5.4. Análise do PCR em tempo real

As reações de qPCR foram feitas utilizando o termociclador *SDS ABI PRISM 7000* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), gentilmente cedido pela empresa AgroGenética. Foi utilizada a quantificação relativa pelo método do 2<sup>-ΔCt</sup>, uma modificação do método 2<sup>-ΔΔCt</sup> descrito por LIVAK (2001), em que não se utiliza a amostra calibradora para a realização dos cálculos. A detecção foi realizada pelo

sistema *SYBR® Green* (Bio-Rad, CA, EUA), sendo o gene da *GAPDH* utilizado como normalizador para quantificação dos genes alvos *FAD2-1*; *FAD2-2*; *GmFAD3A*; *GmFAD3B* e *GmFAD3C*.

As amostras foram analisadas em duas repetições biológicas, quantificadas em corridas independentes, sendo que cada amostra foi analisada em duplicata em cada placa de reação. As análises de quantificação relativa (método comparativo) de cada gene foram feitas em tubos individuais.

Inicialmente foi feito um ensaio para a determinação da concentração ótima de *primer* e da eficiência da reação. Os componentes para cada reação foram 2,5 µL de cDNA (sintetizado como descrito no item 4.2.2.), 5,0 µL de 2X *SYBR® Green Supermix* (tampão, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, *SYBR® Green* e Taq DNA polimerase) e *primer* nas concentrações de 100, 200, 400 e 600 nM. O teste de eficiência foi realizado em diluições seriadas de 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup> do cDNA.

As condições de amplificação para todos os sistemas foram: 50°C por 2 min, para permitir a ação da uracil N-glicosilase; 95°C por 10 min para a ativação da DNA polimerase “*Hot Start*” que é pré-complexada, com um anticorpo monoclonal específico que inibe a atividade da DNA polimerase em temperatura ambiente; 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 s e anelamento e extensão a 60°C durante 30 s. Após 40 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para elaboração da curva de dissociação, a fim de verificar se produtos não específicos e dímeros de *primers* estavam presentes nas misturas de reação. As amostras foram aquecidas com incremento de 1°C durante 30 s, partindo de 60°C até atingir o limite de 94°C.

#### 4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos para as concentrações dos ácidos graxos polinsaturados foram submetidos à análise de variância em um modelo contendo os efeitos dos genótipos (A29, FA22, N85-2176 e Tucunaré) e estágio de desenvolvimento da semente (1° de 0 a 125 mg, 2° de 126 a 250 mg, 3° de 251 a 375 mg, 4° superior a 376 mg e 5° estágio: semente fisiologicamente madura).

O modelo estatístico utilizado na análise foi o modelo fatorial dado por:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + E_j + (GE)_{ij} + e_{ij}$$

em que:

$Y_{ij}$  = valor observado da característica no genótipo i e no estágio j;

$\mu$  = média geral;

$G_i$  = efeito do i-ésimo genótipo;

$E_j$  = efeito do j-ésimo estágio;

$(GE)_{ij}$  = efeito da interação do i-ésimo genótipo com o j-ésimo estágio;

$e_{ij}$  = erro experimental.

Foram realizadas análises de variâncias e teste de Tukey para verificar diferenças significativas entre as médias dos resultados.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GENES (CRUZ, 1997).

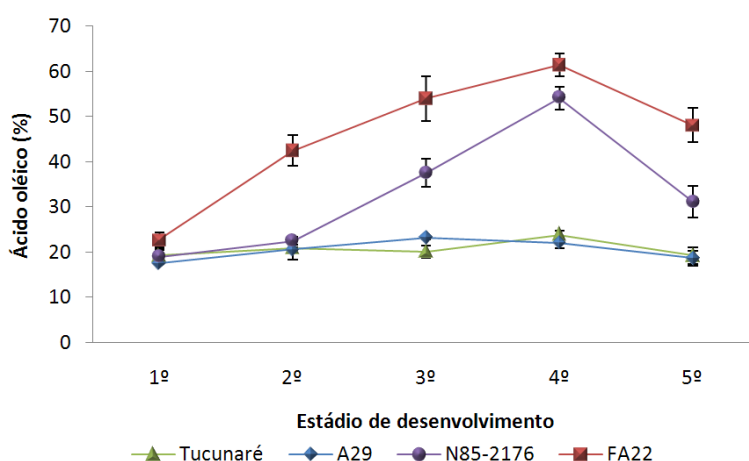
Os resultados de quantificação relativa dos níveis de mRNA dos genes alvos foram avaliados por estatística descritiva, observando-se os desvios padrão e %CV entre as repetições biológicas (entre as corridas) e entre as replicatas (dentro de cada corrida).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CONCENTRAÇÕES DOS ÁCIDOS GRAXOS

As análises de variâncias do modelo fatorial utilizado para avaliar os efeitos dos genótipos, dos estádios de desenvolvimento e da interação genótipo *vs.* estágio de desenvolvimento sobre as concentrações dos ácidos oléico, linoléico e linolênico indicam que o efeito da interação genótipo *vs.* estágio de desenvolvimento foi significativa para os três ácidos graxos. Os resultados dessas análises estão apresentados nos Quadros A, B e C do Apêndice.

As médias das concentrações de ácido oléico para os genótipos Tucunaré, A29, N85-2176 e FA22 durante o desenvolvimento das sementes são apresentadas em forma gráfica na Figura 7. Os dados correspondentes são apresentados no Quadro D do Apêndice.



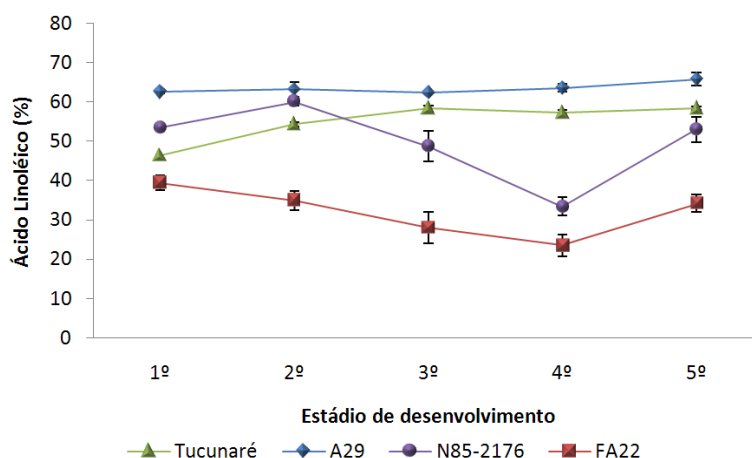
**Figura 7:** Concentrações médias de ácido oléico na fração óleo das sementes dos genótipos Tucunaré, A29, N85-2176 e FA22. As barras verticais representam os desvios padrão. Estádios de desenvolvimento da semente de soja: 1º de 0 a 125 mg; 2º de 126 a 250 mg; 3º de 251 mg a 375 mg, 4º de 376 a 450 mg e 5º corresponde à semente madura fisiologicamente.

A análise dentro de cada estágio revela que A29 e Tucunaré apresentaram perfis semelhantes para a concentração de ácido oléico, sendo observados valores estatisticamente iguais nos 5 estádios avaliados. Os genótipos N85-2176 e FA22

apresentaram valores superiores aos demais. Apenas no 1º estágio, as concentrações de ácido oléico em N85-2176 e em FA22 foram estatisticamente iguais; nos demais estádios as concentrações de ácido oléico em FA22 foram maiores do que os de N85-2176.

De maneira geral, os quatro genótipos estudados apresentaram uma tendência de aumento na concentração de ácido oléico do 1º ao 4º estágio e declínio na passagem do 4º para 5º estágio. Em N85-2176 e FA22 as alterações foram muito superiores às encontradas em Tucunaré e A29. No 3º estágio de A29 e no 4º estágio de Tucunaré, N85-2176 e FA22 foram encontrados os maiores valores dentro de cada genótipo.

As médias das concentrações de ácido linoléico para os genótipos Tucunaré, A29, N85-2176 e FA22 durante o desenvolvimento das sementes são apresentadas em forma gráfica na Figura 8. Os dados correspondentes são apresentados no Quadro E do Apêndice.

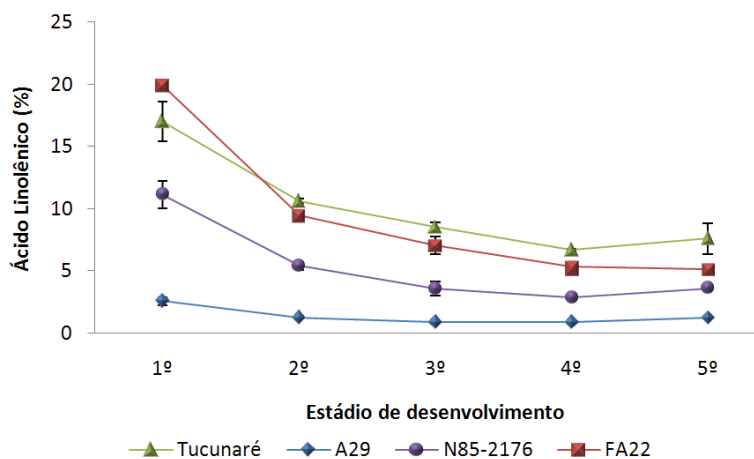


**Figura 8:** Concentrações médias de ácido linoléico na fração óleo das sementes dos genótipos Tucunaré, A29, N85-2176 e FA22. As barras verticais representam os desvios padrão. Estádios de desenvolvimento da semente de soja: 1º de 0 a 125 mg; 2º de 126 a 250 mg; 3º de 251 mg a 375 mg, 4º de 376 a 450 mg e 5º corresponde à semente madura fisiologicamente.

Dentro de cada genótipo, assim como para a concentração de ácido oléico, A29 e Tucunaré apresentaram pouca variação em sua concentração média de ácido linoléico no decorrer do desenvolvimento da semente. Em contraste, FA22 e N85-2176 obtiveram amplitude de variação maior com o desenvolvimento da semente. Em FA22 observa-se redução na concentração de ácido linoléico do 1º ao 4º estágio e aumento da concentração na passagem do 4º para o 5º estágio. Enquanto que N85-2176 apresentou

um comportamento anômalo, aumento do 1º para o 2º estágio, redução do 2º ao 4º estágio e aumento do 4º para o 5º estágio.

As médias das concentrações de ácido linolênico para os genótipos Tucunaré, A29, N85-2176 e FA22 durante o desenvolvimento das sementes são apresentadas em forma gráfica na Figura 9. Os dados correspondentes são apresentados no Quadro F do Apêndice.



**Figura 9:** Concentrações médias de ácido linolênico na fração óleo das sementes dos genótipos Tucunaré, A29, N85-2176 e FA22. As barras verticais representam os desvios padrão. Estádios de desenvolvimento da semente de soja: 1º de 0 a 125 mg; 2º de 126 a 250 mg; 3º de 251 mg a 375 mg, 4º de 376 a 450 mg e 5º corresponde à semente madura fisiologicamente.

A concentração média de ácido linolênico reduziu com o desenvolvimento da semente nos quatro genótipos estudados. O genótipo A29, seguido de N85-2176, apresentou a menor concentração de ácido linolênico em todos os estádios analisados. FA22 e Tucunaré obtiveram as maiores concentrações de ácido linolênico, sendo que apenas no primeiro estágio FA22 apresentou concentração superior ao observado em Tucunaré.

Mudanças na composição de ácidos graxos durante desenvolvimento das sementes de soja, na cultivar Rye, também foram observadas por HEPPARD (1996). Assim como em nossos resultados, houve uma tendência para aumento da concentração de ácido oléico e redução da concentração de ácido linolênico ao longo do desenvolvimento da semente. Em outras sementes de oleaginosas têm se observado maior acúmulo de ácido linolênico durante os estádios iniciais do desenvolvimento,

chegando a valores superiores a 30% (HAMMOND, 1972; WANG & HILDEBRAND, 1988).

Em gergelim (*Sesamum indicum* L.), durante o enchimento do grão, foi observado aumento na concentração de ácido linoléico com o tempo. A concentração de ácido linolênico diminuiu significativamente entre os estádios iniciais correspondentes ao 12º e 18º dia após florescimento, enquanto que a concentração de ácido oléico sofreu pequena variação (CHUNG, 1995). A elevada concentração de ácido linolênico nos estádios iniciais do desenvolvimento possivelmente está relacionado à manutenção da fluidez das membranas em embriões jovens, uma vez que nesse período a biossíntese de membranas é bastante ativa.

O conteúdo final dos ácidos graxos é resultante dos efeitos genéticos, ambientais e da interação entre esses fatores. Influência ambiental sobre o perfil de ácidos graxos na soja têm sido citada em muitos estudos. Um dos fatores ambientais mais estudados e caracterizados é a temperatura durante o crescimento e desenvolvimento das plantas (GIBSON & MULLER, 1996). Sementes que se desenvolvem sob altas temperaturas tendem a apresentar uma diminuição significativa na concentração de ácidos linoléico e linolênico, e um significativo aumento na concentração de ácido oléico (OLIVA, 2006).

Estudos realizados por SILVA (2007) detectaram interação genótipo vs. ambiente significativa para o conteúdo de ácidos graxos entre os genótipos de soja Tucunaré, A29, N85-2176, FA22, N85-2124, C2022, BARC-12, PI417360, CD219RR, CD214RR, CS303TNKCA e Vencedora, em plantios realizados no inverno e verão. O grau de influência do ambiente nos genótipos variou consideravelmente entre as variedades. De maneira geral, as concentrações de ácido palmítico e esteárico sofreram as menores variações quando comparados as concentrações de ácidos graxos polinsaturados. Os genótipos FA22, PI417360 e A29 apresentaram maiores variações das concentrações médias de ácidos graxos entre os ambientes avaliados.

No entanto, as alterações observadas no presente trabalho são possivelmente devidas a efeitos genéticos, uma vez que todas as plantas foram cultivadas na mesma casa de vegetação com temperatura e umidade monitoradas. GOOD-GOD (2004) cita fatores citoplasmáticos e a interação entre genes nucleares e extra-nucleares como importantes componentes na determinação da herança de ácidos graxos, principalmente do ácido oléico.

Efeito de genes menores e a ação do ambiente na expressão fenotípica para os conteúdos de ácidos graxos tem levado alguns autores a considerar a herança para esse

fator como uma característica quantitativa (GRAEF, 1988; FEHR, 1992; GESTEIRA, 1997). Entretanto, já foi constatada herança simples em cruzamentos envolvendo linhagens mutantes, com concentrações modificados de ácidos graxos, evidenciando a presença de genes de efeito maior para essa característica (WILCOX 1984; RAHMAM, 1996)

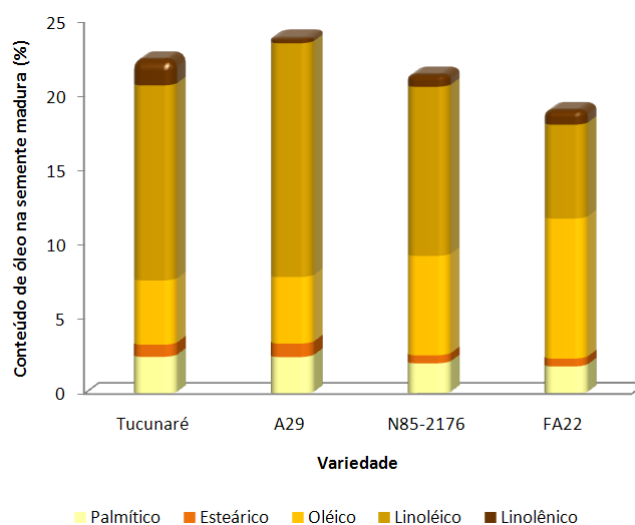
Recentemente, genes que codificam as principais dessaturases de soja foram caracterizados. Para as  $\omega$ -6-dessaturases do retículo endoplasmático são descritos dois genes principais, denominados *FAD2-1* e *FAD2-2* (HEPPARD, 1996). Para a  $\omega$ -3-dessaturase foram identificados três genes principais, denominados *GmFAD3A*, *GmFA3B* e *GmFAD3C* (BYLIEU, 2003).

As diferenças nas concentrações dos ácidos graxos polinsaturados nos quatro genótipos analisados no presente trabalho podem ser devidas a diferentes mecanismos de regulação da expressão dos genes *FAD2-1*, *FAD2-2*, *GmFAD3A*, *GmFA3B* e *GmFAD3C* e/ou das atividades das  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 dessaturases.

## 5.2. CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO TOTAL

A concentração de óleo total na semente é outra característica que merece atenção especial. Todos os resultados anteriormente apresentados correspondem a concentração média de cada ácido graxo em relação aos cinco principais ácidos graxos presentes na semente de soja. A determinação da composição de ácido graxos tomando como referência a concentração de óleo bruto reflete de um modo mais preciso a quantidade final de ácido graxo produzida em cada semente.

A composição percentual de ácidos graxos tomando-se como referência a concentração de óleo total nas sementes fisiologicamente maduras (5° estágio) é apresentada na Figura 10. Observam-se variações de 19 a 24% na concentração de óleo total nos diferentes genótipos. Os maiores valores foram observados para A29, seguida de Tucunará e N85-2176. O genótipo FA22 foi o que apresentou a menor concentração de óleo total entre os estudados.



**Figura 10:** Concentração de óleo total (% peso seco) e composição média de ácidos graxos na fração óleo das sementes de soja madura.

Apesar do genótipo A29 produzir mais óleo que FA22, a quantidade de ácido linolênico produzida na semente em A29 foi inferior à quantidade sintetizada em FA22. O mesmo efeito foi observado para o conteúdo de ácido oléico entre as duas variedades, a quantidade de ácido oléico produzida foi superior em FA22.

LANNA (2002) avaliou a concentração de óleo total durante o desenvolvimento da semente na variedade comercial CAC-1 e na linhagem CC4 cultivadas nas temperaturas de 34/28°C e 22/13°C. Foi observado que o conteúdo de óleo foi crescente até os últimos estádios de desenvolvimento nos dois ambientes avaliados. Além disso, assim como em nossos resultados, a combinação dos valores da concentração de óleo total e de ácidos graxos não provocou grandes alterações na quantidade final de ácidos graxos produzidos.

### 5.3. ATIVIDADE RELATIVA DAS DESSATURASES

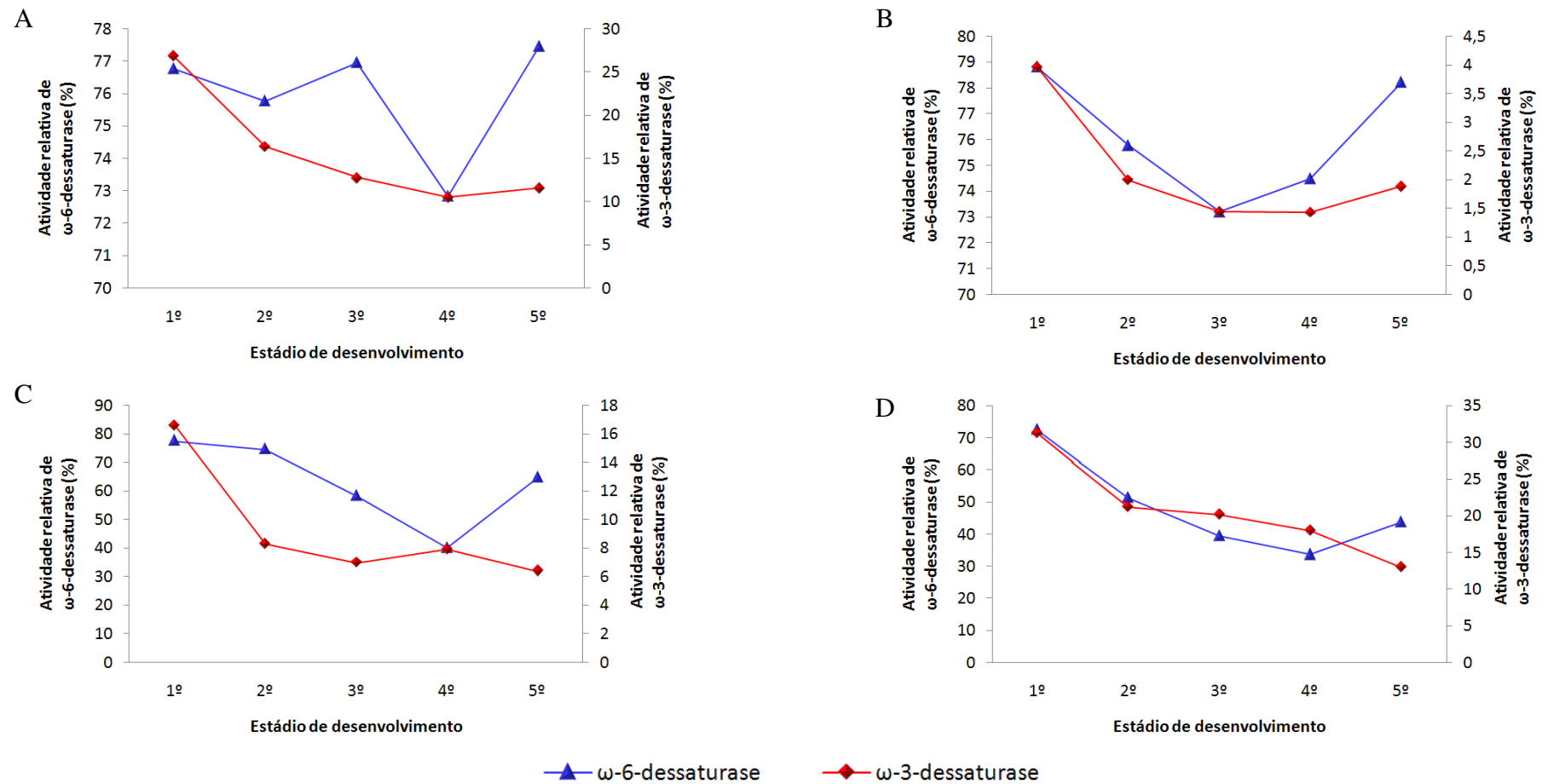
A atividade *in vitro* da  $\omega$ -6-dessaturase e  $\omega$ -3-dessaturase envolve protocolos complexos e, na maioria dos casos, utilizam-se compostos radioativos, o que torna a metodologia muito trabalhosa. Outra limitação é a dificuldade de obter extratos protéicos purificados com atividade enzimática, visto que essas enzimas estão ancoradas nas membranas celulares. A metodologia descrita por WILSON (2004) leva em consideração as concentrações médias dos ácidos graxos insaturados para estimar a atividade relativa dessas enzimas, podendo ser considerado um método muito mais

prático do que a determinação da atividade enzimática *in vitro*. Os valores estimados das atividades das dessaturases pelo método descrito por WILSON (2004) são apresentados na Figura 11.

Para cada genótipo o formato do gráfico de atividade relativa *vs.* estágio de desenvolvimento teve características peculiares, o que indica que o perfil da atividade relativa está diretamente relacionada com o *background* genético. De maneira geral, a atividade relativa estimada de  $\omega$ -3-dessaturase foi menor que a de  $\omega$ -6-dessaturase em todos os estádios de desenvolvimento e genótipos. A atividade relativa de  $\omega$ -6-dessaturase foi alta no 1º estágio, decaindo nos estádios intermediários e elevando-se nos estádios finais. Já a  $\omega$ -3-dessaturase teve redução da atividade com o desenvolvimento da semente.

Os valores estimados da atividade relativa das duas dessaturases foram diretamente relacionados às concentrações médias dos ácidos graxos dos genótipos. FA22 apresentou os menores valores para  $\omega$ -6-dessaturase, seguido de N85-2176. A29 e Tucunaré apresentaram valores muito próximos de atividade para essa enzima. Para a atividade de  $\omega$ -3-dessaturase os menores valores observados foram em A29, seguida de N85-2176 e Tucunaré. Fato interessante é que a concentração de ácido linolênico em Tucunaré foi superior ao encontrado em FA22, no entanto os valores de atividade de  $\omega$ -3-dessaturase em FA22 foram maiores.

Os perfis das curvas de atividade de  $\omega$ -3-dessaturases *vs.* estágio de desenvolvimento foram semelhantes aos encontrados na cultivar Dare. No entanto, o perfil para a  $\omega$ -6-dessaturase foi um pouco modificado apresentando-se apenas como uma curva crescente, tendo um platô nos estádios finais (WILSON, 2004).



**Figura 11:** Atividade relativa das dessaturases nas variedades Tucunaré (A), A29 (B), N85-2176 (C) e FA22 (D), baseada nas concentrações médias dos ácidos graxos insaturados. Estádios de desenvolvimento da semente de soja: 1º de 0 a 125 mg; 2º de 126 a 250 mg; 3º de 251 mg a 375 mg, 4º de 376 a 450 mg e 5º corresponde à semente madura fisiologicamente.

Cabe ressaltar que os valores reais de atividade enzimática *in vitro* podem ser diferentes aos encontrados pelo cálculo da atividade baseado no perfil de ácidos graxos. Dessa forma, não é coerente inferir conclusões a respeito da regulação a nível de atividade enzimática apenas com os dados apresentados até o momento.

Grande parte dos estudos de atividade *in vitro* versa sobre o aumento no conteúdo de ácidos graxos polinsaturados em baixas temperaturas. CHEESBROUGH (1989) avaliou a atividade enzimática em plantas cultivadas inicialmente em casa de vegetação com temperaturas de 28/25°C e posteriormente cultivadas por 20 h a 20°C, 25°C, e 35°C. As atividades de  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 dessaturases foram, respectivamente, 94 e 10 vezes mais ativas, nas sementes cultivadas tanto a 20°C como a 25°C. Ambas as dessaturases apresentaram atividades extremamente baixas quando cultivadas a 35°C. Esses resultados sugerem que as dessaturases podem ser rapidamente reguladas devido a alterações na temperatura.

Muitas teorias têm sido propostas para explicar essas alterações. Inicialmente, acreditava-se que a diferença de solubilidade de O<sub>2</sub> no citoplasma pudesse regular atividade da dessaturase. Uma teoria alternativa sugere que este fenômeno possa ser devido à modulação da fluidez da membrana, de forma a alterar a exposição do sítio ativo da enzima no citosol. Os modelos são bastante interessantes, mas não descrevem adequadamente o mecanismo biológico que medeia os efeitos da temperatura sobre a atividade de dessaturase (WILSON, 2004).

Atualmente, acredita-se que a atividade possa ser regulada por eventos de transdução de sinais que resultam na fosforilação da enzima. TANG (2005) sugere que o resíduo de serina na posição 185 da  $\omega$ -6-dessaturase, possa ser fosforilado por cinases. A substituição do resíduo de serina 185 por aspartato ou glutamato resultou na redução da atividade, indicando que a fosforilação leva a inibição da atividade enzimática.

Esse mecanismo pode ser extrapolado para explicar a alteração na composição de ácidos graxos durante a ontogenia da semente, onde a enzima é fosforilada ou desfosforilada dependendo da condição fisiológica da célula. No entanto, estudos posteriores envolvendo atividade enzimática *in vitro* devem ser realizados para comprovar essa hipótese.

## 5.4. ANÁLISE DO ACÚMULO DE TRANSCRITOS

### 5.4.1. Confeções dos *primers*

Os *primers* foram desenhados utilizando o programa *Primer 3* e a sua especificidade foi confirmada pelo seu alinhamento com as seqüências originais dos genes utilizado o programa VECTOR NTI<sup>®</sup>. Esse procedimento foi necessário devido ao alto grau de identidade observado, principalmente, entre os genes *GmFAD3*. *GmFAD3A* e *GmFAD3B* possuem 94% de identidade de seqüência, enquanto que os pares *GmFAD3A* e *GmFAD3B*, e *GmFAD3B* e *GmFAD3C* possuem, ambos, 79% de identidade (BILEY, 2003). Os genes *FAD2-1* e *FAD2-2* possuem certa similaridade de seqüência, porém muito inferior aos valores observados entre os genes *GmFAD3* (HEPPARD, 1996). Os *primers* selecionados e seus alinhamentos são mostrados nas Tabela 2 e Figura 12.

**Tabela 2:** Conjunto de *primers* selecionado para a quantificação dos níveis de transcritos por PCR em tempo real.

Gene	Número de Acesso (GeneBank)	Primer	Tamanho dos Fragmentos
<i>GAPDH</i>	DQ192668	F 5' GTTGAGGGTTTGATGACCA 3' R 5' CAGCTCTTCCACCTCTCCAG 3'	93 pb
<i>FAD2-1</i>	L43920	F 5' GGGAGGTAGAGGTCGTGTGG 3' R 5' ACACTGCTTTCAGCGCTCC 3'	132 pb
<i>FAD2-2</i>	L43921	F 5' CTGATGTTCCCTCCTGCCAAC 3' R 5' CATTCCACCTCACTGTTTCCA 3'	117 pb
<i>GmFAD3A</i>	AY204710	F 5' ATCTATTGGCCCATTCAAGGA 3' R 5' ATGTGTCCCACCAGGCTATTT 3'	112 pb
<i>GmFAD3B</i>	AY204711	F 5' GCTGCAGCAATTCACCTTCG 3' R 5' AGGCTATTCAGCAAAGGGCTA 3'	139 pb
<i>GmFAD3C</i>	AY204712	F 5' ATGGTTCAAGCACAGCCTCTA 3' R 5' GAAGGGTGGTGGAGCACTT 3'	89 pb



**Figura 12:** Alinhamento dos pares de *primers* para os genes *GmFAD3A* (A), *GmFAD3B* (B), *GmFAD3C* (C), *FAD2-1* (D) e *FAD2-2* (E) com os genes de maior similaridade. Os nucleotídeos marcados em azul corresponde aos idênticos entre as seqüências analisadas em cada alinhamento. Os *primers* reversos foram representados em suas seqüências complementares.

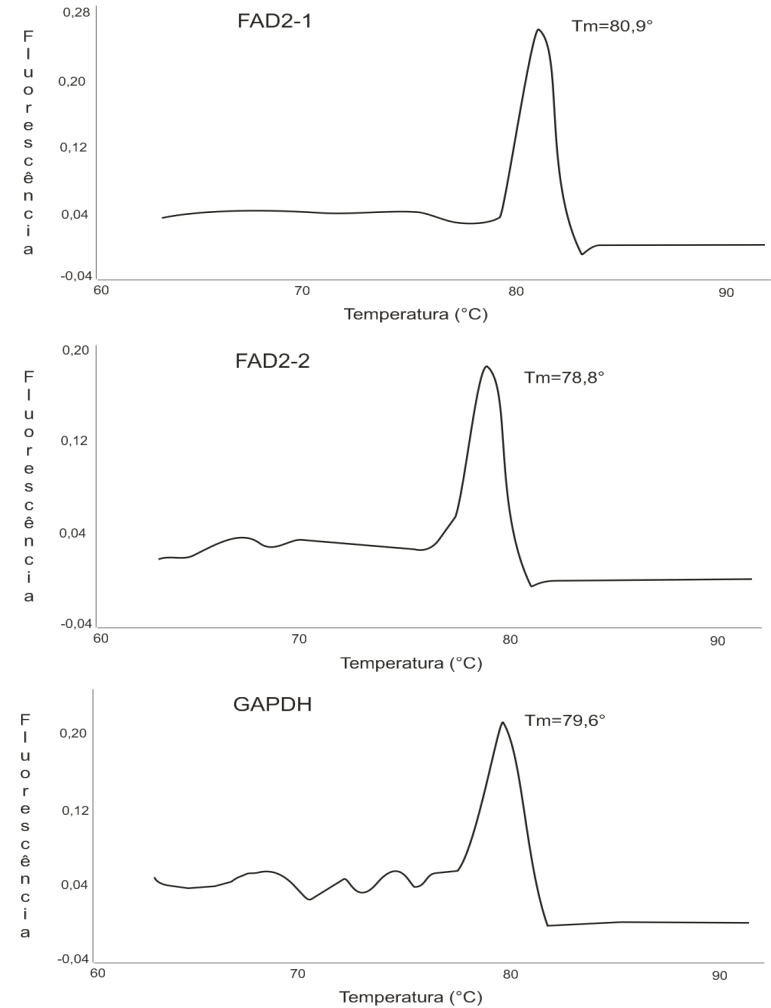
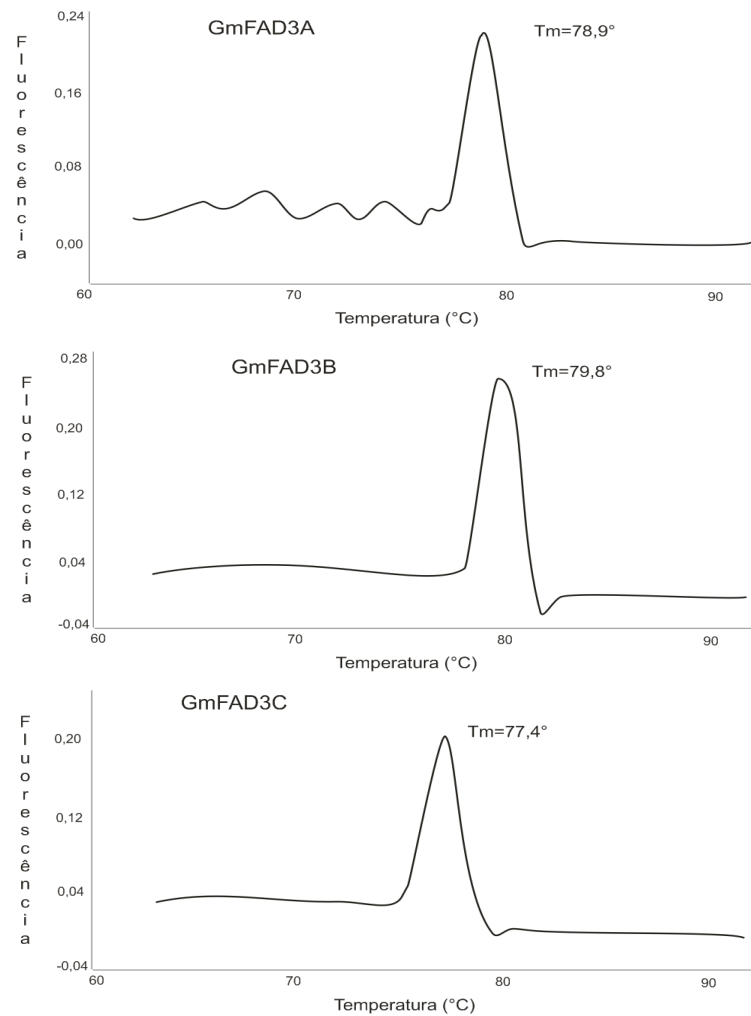
Apesar da alta identidade entre as seqüências dos genes *GmFAD3A* e *GmFAD3B*, foi possível selecionar pares de *primers* capazes de diferenciá-los. Observa-se na Figura 12 que para esses dois genes as diferenças entre o *primer* e a seqüência não alvo está localizada principalmente na extremidade 3' do *primer*. A Taq Polimerase normalmente não amplifica fragmentos em que o *primer* não esteja com seus nucleotídeos totalmente pareados à seqüência alvo na sua extremidade 3'.

#### 5.4.2. Condições das reações de amplificação

A especificidade dos conjuntos de *primers* utilizados na quantificação dos transcritos dos genes alvos pode ser observada pela curva de dissociação. A presença de um pico confirma a amplificação de apenas um amplicon. Diferenças entre amplicons, como alterações de um par de base, são suficientes para gerar curvas de dissociações com perfis distintos, uma vez que alteraram o valor de Tm do amplicon. As curvas de dissociações e os Tm's dos amplicons obtidos a partir dos *primers* desenhados na tabela 2 são mostrados na Figura 13. A curva de dissociação gerada para os produtos de amplificação demonstrou que cada par de *primers* amplificou um único fragmento, indicando ausência de dímeros de *primers* e amplificações inespecíficas.

A eficiência foi calculada plotando-se graficamente os valores obtidos de Ct no eixo das ordenadas e o logaritmo dos valores de cada diluição no eixo das abscissas. O valor do coeficiente angular (s) da reta é utilizado para o cálculo da eficiência, utilizando a fórmula: Eficiência PCR =  $(10^{(1/s)} - 1) \times 100$ . Coeficiente com valor de -3,32 indica que a reação de PCR apresenta 100% de eficiência (GINZINGER, 2002).

Os valores das concentrações de *primers* e das referidas eficiências de PCR para os cinco pares de *primers* dos genes estudados são mostrados na Tabela 3. Os valores foram superiores a 90% para os pares de *primers* dos genes *GmFAD3A*, *GmFAD3B*, *GmFAD3C* e *GAPDH*, enquanto que para os genes *FAD2-1* e *FAD2-2* foram obtidos valores superiores a 80%. Esses valores elevados de eficiência validam o experimento e conseqüentemente permitem as análises de quantificação de transcrito utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK, 2001).



**Figura 13:** Curvas de Dissociação e Tm para os amplicons gerados a partir da amplificação com os pares de *primers* para os cinco genes estudados e o normalizador (*GAPDH*).

**Tabela 3:** Valores de eficiência da PCR para os cinco pares de *primers* dos genes estudados e do normalizador.

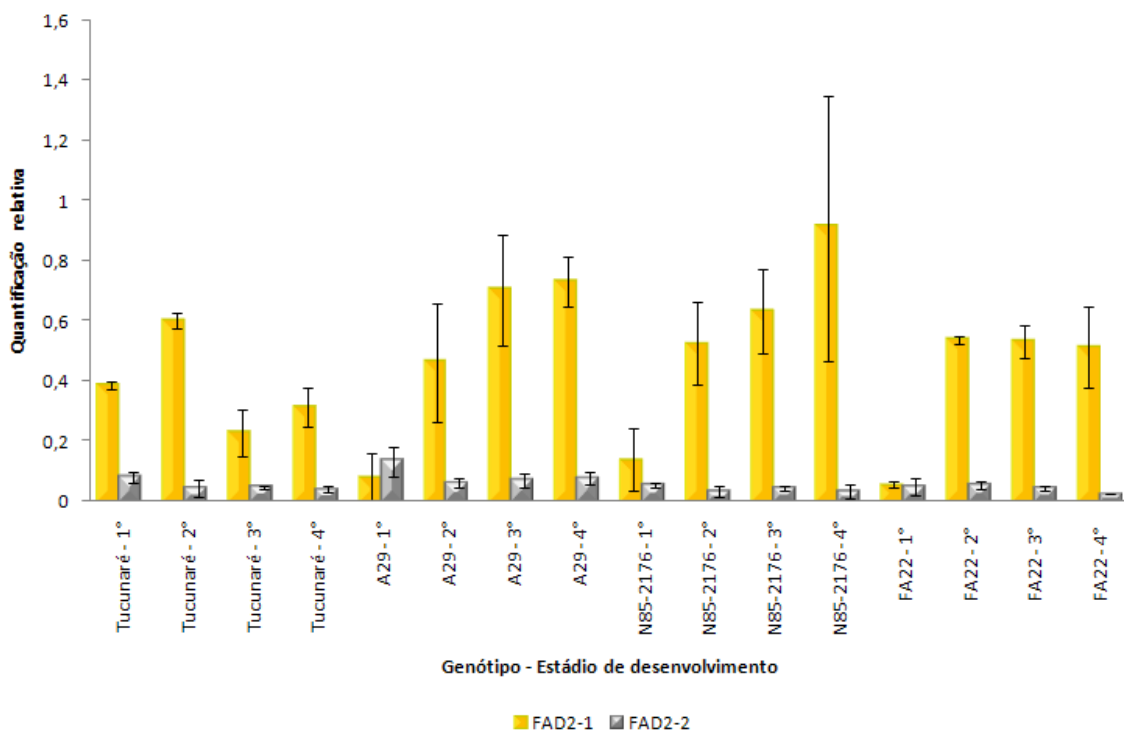
<i>Primer</i>	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Eficiência
<i>GmFAD3A</i>	0,6	97,27%
<i>GmFAD3B</i>	0,6	99,41%
<i>GmFAD3C</i>	0,2	93,19%
<i>FAD2-1</i>	0,6	82,91%
<i>FAD2-2</i>	0,8	82,40%
<i>GAPDH</i>	0,2	93,83%

#### 5.4.3. Acúmulo de transcritos que codificam para as dessaturases

A via de biossíntese de ácidos graxos insaturados envolve diferentes compartimentos celulares, como plastídios e retículo endoplasmático. As etapas finais para a produção de ácidos graxos insaturados de reserva em sementes ocorre no retículo endoplasmático pela ação sucessiva da  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3-dessaturases. Os mecanismos de regulação dessa via ainda não foram esclarecidos. A quantificação dos níveis de transcritos das dessaturases durante o desenvolvimento da semente constitui uma ferramenta para o melhor entendimento da sua regulação, uma vez que o perfil de ácidos graxos varia com estado fisiológico do tecido. Dessa forma, espera-se um controle rigoroso dependente do estágio de desenvolvimento em que a semente se encontra, além de perfis diferenciados entre os genótipos contrastantes para os conteúdos de ácidos graxos polinsaturados avaliados. Com o objetivo de verificar se há correlação entre os níveis de mRNA e as concentrações de ácidos graxos nos diferentes estádios e entre genótipos contrastantes foram avaliados o acúmulo de transcrito dos genes *FAD2-1* e *FAD2-2*, que codificam as  $\omega$ -6-dessaturases, e dos genes *GmFAD3A*, *GmFAD3B* e *GmFAD3C*, que codificam as  $\omega$ -3-dessaturases. A partir dos resultados espera-se inferir sobre os possíveis mecanismos de regulação envolvidos na biossíntese de ácidos graxos.

### 5.4.3.1. Acúmulo de transcritos que codificam para as $\omega$ -6-dessaturases

As médias dos valores de mRNAs dos genes *FAD2-1* e *FAD2-2* são mostrados na Figura 14.



**Figura 14:** Quantificação relativa dos genes *FAD2-1* e *FAD2-2* nos genótipos Tucunaré, A29, N85-2176 e FA22. As linhas representam os desvios padrão entre as médias dos valores de quantificações relativas entre as duas repetições. Dados originais são mostrados nos Quadros G e H no apêndice. Estádios de desenvolvimento da semente de soja: 1º de 0 a 125 mg; 2º de 126 a 250 mg; 3º de 251 mg a 375 mg, 4º de 376 a 450 mg.

A avaliação entre os estádios de desenvolvimento demonstrou que os genótipos A29, N85-2176 e FA22 apresentaram perfis muito semelhantes entre si. O acúmulo de transcrito do gene *FAD2-1*, dentro desses genótipos, foi menor no primeiro estágio de desenvolvimento. Para o gene *FAD2-2*, todos os quatro genótipos apresentaram maior acúmulo de transcrito no estágio inicial, reduzindo com o desenvolvimento da semente.

HEPPARD (1996) avaliou o acúmulo de transcrito desses dois genes, na cultivar de soja Rye, e observou que *FAD2-2* apresentou maior acúmulo de transcrito que *FAD2-1* nos estádios iniciais de desenvolvimento da semente, período em que ocorre intensa síntese de ácidos graxos de membrana. Em outros tecidos, como folhas caule e

raiz, foi detectado transcritos de *FAD2-2*, mas os níveis de transcritos de *FAD2-1* foram inferiores aos níveis de detecção. Assim, é muito provável que o gene *FAD2-2* esteja relacionado à biossíntese de ácido linoléico para as membranas celulares, e a sua regulação seja dependente do estágio de desenvolvimento.

No genótipo Tucunaré, o acúmulo de transcrito de *FAD2-1* no 1º estágio foi menor que no 2º; já no 3º e 4º estágios foi observada uma nova redução no acúmulo de transcrito desse gene. Diferentemente, os genótipos A29, N85-2176 e FA22 apresentaram o acúmulo de transcrito de *FAD2-1* aumentado com o desenvolvimento da semente (Figura 14). Resultados semelhantes aos encontrados nessas três genótipos foram observados por HEPPARD (1996) e LIMA (2005). O nível de transcrito de *FAD2-1* aumentou rapidamente durante o desenvolvimento da semente, apresentando um pico nas fases iniciais de maturação e gradualmente diminuindo quando o grau de maturação da semente aumentava. Os estágios intermediários e finais correspondem ao período de maior síntese de ácidos graxos de reserva e deposição de óleo nos oleossomos. Dessa forma, fica evidente que o gene *FAD2-1* é relacionado com a biossíntese de ácido linoléico destinado à biossíntese de reservas.

As divergências temporais de níveis de transcrito de *FAD2-1* e *FAD2-2* podem ser devidas a mecanismos de regulação distintos. Vale ressaltar que as regiões 5' e 3' não traduzidas desses dois genes são muito diferentes entre si. Comparações da região promotora de *FAD2-1* com a de genes que codificam proteínas de reserva de sementes mostraram alta similaridade de seqüências, reforçando a hipótese de que *FAD2-1* seja específico para sementes em desenvolvimento (HEPPEARD, 1996).

Apesar de o desenvolvimento fisiológico da semente levar ao aumento da concentração de ácido oléico na fração óleo (Figura 7), foi observado que os níveis do transcrito de *FAD2-1* aumentam com o desenvolvimento da semente (Figura 14). Possivelmente o aumento do nível de transcrito de *FAD2-1* não seja suficiente para converter o excesso de ácido oléico que é sintetizado nos estágios intermediários do desenvolvimento da semente.

Entre os genótipos estudados, FA22 e N85-2176 são os que apresentam maiores concentrações de ácido oléico em suas sementes (Figura 7). No entanto, não foi observada diminuição no nível de transcrito dos genes *FAD2-1* e *FAD2-2* nesses genótipos (Figura 14). Dessa forma, a regulação da via de produção de ácido oléico/linoléico deve ser pós-transcricional, ou devido a diferenças de expressão de outros genes.

Estudo semelhante em sementes de milho, com 25 dias após a polinização, verificou que os níveis de transcritos de dois alelos para *fad2* também não apresentaram alterações em genótipos com concentrações de ácido oléico contrastantes (BELÓ, 2007).

Em diferentes temperaturas de cultivos também não têm sido verificadas alterações nos níveis de transcrito dos genes *FAD2*, apesar do aumento nas concentrações de ácidos linoléico e linolênico em plantas cultivadas em baixas temperaturas. Em *Arabidopsis*, o gene *FAD2* tem sido relatado como necessário para o crescimento e a sobrevivência das planta em baixas temperaturas (MIQUEL, 1992), mas nenhuma alteração nos níveis de transcrito foi observada quando as plantas foram transferidas de 22 para 6°C (OKULEY, 1994). Na soja, os níveis de transcritos *FAD2-1* e *FAD2-2* permaneceram praticamente constantes nas temperaturas de 28/22°C, 22/18°C e 18/12°C. Na temperatura mais elevada (32/28°C) o acúmulo de transcrito desses genes foram superiores, contrariamente aos resultados teoricamente esperados (HEPPARD, 1996).

No entanto, em amendoim (*Arachis hypogaea* L.) os níveis de transcritos de *ahFAD2A* e *ahFAD2B* apresentaram valores diferenciados. Em sementes com conteúdos normais de ácido oléico os genes foram normalmente expressos, enquanto que em sementes mutantes, apresentando alto concentração de ácido oléico, o nível de transcrito de *ahFAD2B* foi severamente reduzido (PATEL, 2004). Esse trabalho indica que as concentrações de ácidos graxos polinsaturados podem ser relacionados com o acúmulo de transcritos de alguns genes codificantes para  $\omega$ -6-dessaturase.

Estudos envolvendo plantas transgênicas dão suporte a essa hipótese. A co-supressão de *FAD2* em canola (*Brassica napus*) (STOUTJESDIJK, 2000), silenciamento por RNA anti-senso para *FAD2* em soja (BUHR, 2002) e silenciamento mediado por *hairpin* de RNA em algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (LIU, 2002), levaram à redução ou inibição da expressão das dessaturases e conseqüentemente ao aumento no conteúdo de ácido oléico.

Plantas transgênicas de algodão transformadas com um alelo *fad2* de canola não funcional apresentaram um aumento na concentração de ácido oléico de 15% para 21 a 30%. As progênies de algumas desses transformantes mantiveram níveis elevados de ácido oléico, chegando até 47%. Além disso, análises moleculares do DNA nuclear comprovaram a integração do gene *fad2* da canola no genoma do algodão (CHAPMAN, 2001). A supressão do gene *FAD2-1* em soja deu origem a linhagens transgênicas com

concentrações de ácidos graxos polinsaturados menor que 5% e concentração de ácido oléico que excede a 80% (KINNEY, 1996).

A análise de acúmulo de transcritos dos genes para as dessaturase em outras culturas tem comprovado a existência de mais de um gene para as  $\omega$ -6-dessaturases, com expressões diferenciadas dependendo do tecido. Em oliva (*Olea europaea*) foram identificados dois cDNAs, *OeFAD2* e *OeFAD6*, que codificam as  $\omega$ -6 dessaturases. A proteína codificada por *OeFAD2* contém um motivo C-terminal de proteínas do retículo endoplasmático, enquanto que aquela codificada por *OeFAD6* possui um peptídeo sinal plastidial no N-terminal. A quantificação de transcrito por PCR-quantitativo mostrou que o gene *OeFAD2* foi constitucionalmente expresso, com o máximo acúmulo de transcritos no mesocarpo e o gene *OeFAD6* foi expresso regularmente em endosperma e embriões (BANILAS, 2005).

Em algodão (*Gossipum hirsutum*) é descrita a presença de pelo menos quatro membros na família gênica da  $\omega$ -6-dessaturase. O *FAD2-1* é semente-específico, enquanto que o *FAD2-2* apresenta um baixo nível de transcritos em sementes e possui expressão constitutiva em outros órgãos. Já os genes *FAD2-3* e *FAD2-4* parecem ser induzidos pelo frio (KARGIOTIDOU, 2008).

Em girassol (*Helianthus annuus* L.) foram caracterizadas três diferentes sequências cDNA que codificam  $\omega$ -6-dessaturases, designados *Ha89FAD2-1*, *Ha89FAD2-2*, e *Ha89FAD2-3*. Foram identificadas duas cópias de *Ha89FAD2-1* no DNA genômico e uma para os demais genes. O acúmulo de transcrito dos genes foram avaliadas por *Northern blot* no desenvolvimento do embrião, germinação do cotilédone, folhas, hipocótilo e raiz, em cultivares com conteúdos normais e elevados de ácido oléico. Os níveis de transcritos dos genes *Ha89FAD2-2* e *Ha89FAD2-3* foram baixos em todos os tecidos nas duas variedades estudadas. Porém, os níveis de transcritos do gene *Ha89FAD2-1* foi muito alto no desenvolvimento de embriões do tipo normal, enquanto que a nos embriões com alta concentração de ácido oléico foi drasticamente reduzido. Assim possivelmente a mutação para a alta cocntração de ácido oléico em girassol interfere na regulamentação da transcrição de genes *FAD2* semente específica (MARTÍNEZ-RIVAS, 2001).

TANG (2005) descreveu a existência de mais um gene que codifica  $\omega$ -6-dessaturase em soja, designado de *FAD2-1B*. *FAD2-1A* (anteriormente descrito como *FAD2-1*) e *FAD2-1B* possuem 93,8% de nucleotídeos idênticos e diferem em apenas 24 resíduos de aminoácidos na proteína final. A expressão heteróloga desses genes em

leveduras revelaram que *FAD2-1A* é mais instável que *FAD2-1B*, especialmente quando culturas foram mantidas em elevadas temperaturas de crescimento.

Esses resultados observados em levedura foram confirmados em soja por BYFIELD (2007). Foram avaliadas as quantidades dos transcritos dos genes *FAD2-1A* e *FAD2-1B* em três variedades de soja (Dare, A6 e N01-3544) cultivadas em três temperaturas (22/18, 26/22 e 30/26° C). Na temperatura mais baixa, o acúmulo de transcrito dos genes foram significativamente elevados, com o níveis de *FAD2-1B* superiores em 2 a 10 vezes aos de *FAD2-1A*, nas sementes com 35 dias após florescimento. A redução do nível de transcrito de *FAD2-1A* e *FAD2-1B* com o aumento da temperatura foi positivamente correlacionada com o aumento no conteúdo de ácido oléico e redução no conteúdo de ácido linolênico, nas três variedades, evidenciando que esses genes respondem a modificações na temperatura.

Estudos realizados por SCHLUETER (2007) comprovaram que os genes *FAD2* constituem uma família gênica. Segundo o autor, nessa família existem pelo menos 5 membros distintos, denominados *FAD2-1A*, *FAD2-1B*, *FAD2-2A*, *FAD2-2B* (anteriormente descrito como *FAD2-2*) e *FAD2-2C*. Esses genes já foram identificados nos grupos de ligação propostos por CREGAN (1994). O gene *FAD2-1A* foi mapeado no grupo de ligação O, o gene *FAD2-1B*, no grupo de ligação I, e os genes *FAD2-2A* e *FAD2-2B*, no grupo de ligação L. Os genes *FAD2-1A* e *FAD2-1B* mostram indícios de splicing alternativo no códon inicial de metionina. Os transcritos que possuem o códon para a metionina foram denominados *FAD2-1A\_S* e *FAD2-1B\_S*, e os sem o códon para metionina, *FAD2-1A\_L* e *FAD2-1B\_L*. A quantificação do transcrito desses genes na cultivar de soja William 82 identificou padrões diferenciados de acúmulo nas vagens, cotilédones, folhas e raiz. Os transcritos do gene *FAD2-2A* não foram detectados em nenhum tecido avaliado, sugerindo que este gene não é expresso nesses tecidos ou que não é funcional. Os transcritos de *FAD2-1* (*FAD2-1A\_L*, *FAD2-1A\_S*, *FAD2-1B\_L* e *FAD2-1\_S*) não foram detectados nos estádios iniciais de desenvolvimento da semente, sendo apenas detectados no decorrer do desenvolvimento da semente. Os transcritos do gene *FAD2-2B* (*FAD2-2*) foram detectados em todos os tecidos e durante todo o desenvolvimento da semente. As análises comparativas em duas condições de temperatura, 32/28°C e 18/12°C, resultaram em aumento significativo do nível do transcrito apenas do gene *FAD2-2C* em baixa temperatura, indicando que o mesmo também é responsável pelas mudanças nos conteúdos de ácidos graxos devido a alterações na temperatura.

Um sexto membro, *FAD2-3*, foi caracterizado por LI (2007). Experimentos de PCR semi-quantitativo revelaram que *FAD2-3* é um gene de expressão constitutiva nos tecidos vegetais e no desenvolvimento das sementes. A avaliação do acúmulo de transcrito dos genes das dessaturases em sementes de soja da variedade Meng8206 cultivadas em diferentes temperaturas (32/28°C, 28/22°C, 18/12°C e 12/8°C) mostrou que esse fator não provoca nenhuma alteração no nível de transcritos de *FAD2-3*. Esses resultados evidenciam que esse gene também não responde a mudanças de temperatura.

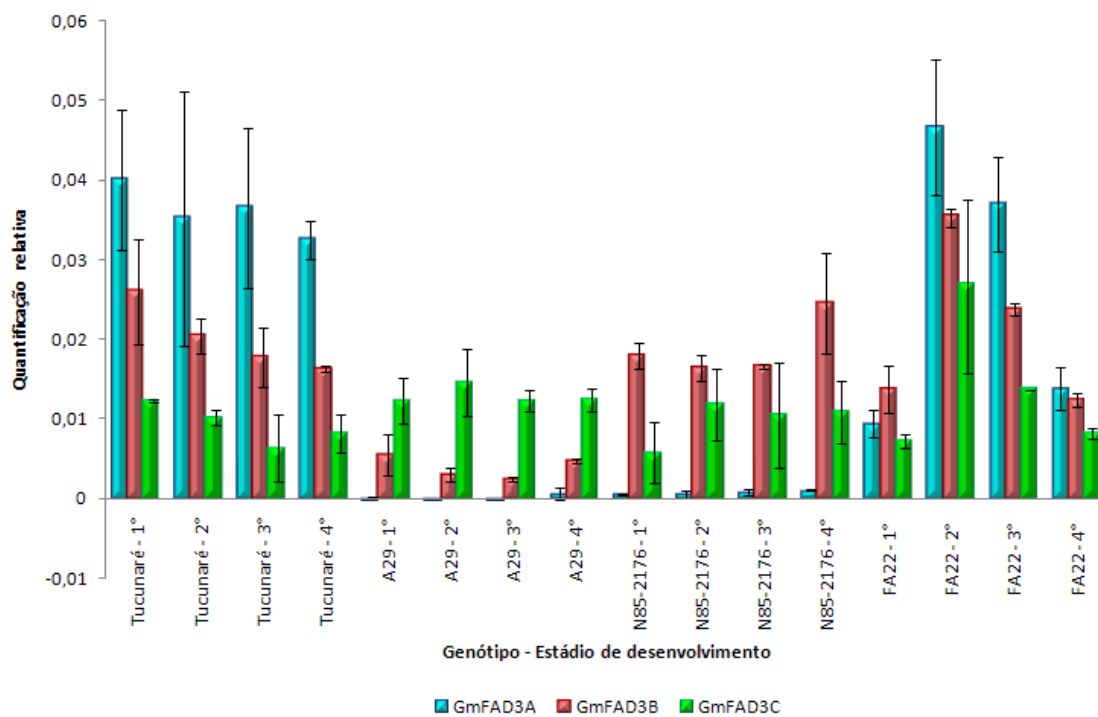
Outra hipótese que pode explicar o maior acúmulo de ácido oléico em FA22 e N85-2176 é que as mutações nos alelos desses genótipos podem ter provocado alterações na seqüência codificante de *FAD2-1*. As dessaturases possuem em seu sítio ativo três *boxes* de histidina ligadas coordenadamente a dois átomos de ferro. Mutações que produzam modificações nos resíduos de aminoácidos nessa região podem levar a alterações conformacionais na proteína tornando-a inativa.

Além disso, as mutações nos alelos de FA22 e N85-2176 podem ter originado códons de parada resultando na produção da proteína truncada. Essa hipótese é reforçada pelos experimentos desenvolvidos por HU (2006) em canola. Foram identificados dois locos relacionados com o conteúdo de ácido oléico, um de efeito maior (*fad2*) e outro de efeito menor. Dentre os alelos caracterizados nestes locos, foram identificadas mutações de substituição que geraram códons de parada, levando à produção de uma enzima inativa, o que resultou em conteúdos elevados de ácido oléico.

Desta forma, fica clara a necessidade de estudos posteriores, como a determinação da atividade *in vitro*, seqüenciamento dos alelos e estudo da expressão dos outros genes integrantes da família gênica de *FAD2* para se ter um melhor entendimento do nível de regulação da reação catalisada pela de  $\omega$ -6-dessaturase nesses genótipos.

### 5.4.3.2. Acúmulo de transcritos que codificam para as para $\omega$ -3-dessaturases

As médias dos valores de mRNAs dos genes *GmFAD3A*, *GmFAD3B* e *GmFAD3C* são mostrados na Figura 15.



**Figura 15:** Quantificação relativa dos genes *GmFAD3A*, *GmFAD3B* e *GmFAD3C* nos genótipos Tucunará, A29, N85-2176 e FA22. As linhas representam os desvios padrão entre as médias dos valores de quantificações relativas entre as duas repetições. Dados originais são mostrados nos Quadros I, J e L no apêndice. Estádios de desenvolvimento da semente de soja: 1° de 0 a 125 mg; 2° de 126 a 250 mg; 3° de 251 mg a 375 mg, 4° de 376 a 450 mg.

No genótipo de soja Tucunará observou-se que nos quatro estádios de desenvolvimento analisados, os níveis de transcritos do gene *GmFAD3A* foram maiores, seguido dos transcritos dos genes *GmFAD3B* e *GmFAD3C* (Figura 15). Em FA22 o mesmo padrão foi observado nos 2°, 3° e 4° estádios.

Resultados semelhantes foram encontrados por BYFEILD (2007) na variedade de soja Dare cultivada a 22/18°C. BILYEU (2003), estudando o acúmulo de transcrito desses genes na variedade de soja Williams 82, no estádio R5, observou um incremento de 60% nos transcritos do gene *GmFAD3A* comparado com o controle endógeno. Já

para o transcrito do gene *GmFAD3C* o incremento foi muito reduzido, 0,2%. Os transcritos do gene *GmFAD3B* não obtiveram níveis detectáveis. Assim, muito provavelmente, o gene *GmFAD3A* seja o principal responsável pela biossíntese de ácido linolênico em sementes.

Entres os estádios de desenvolvimento foi observado que apenas FA22 teve um comportamento anômalo para o acúmulo de transcritos dos genes *FAD3*, mas nenhuma correlação foi observada com o conteúdo de ácido linolênico (Figuras 9 e 15). Nos genótipos Tucunaré, A29 e N85-2176 pouca alteração foi observada nos níveis de transcritos dos três genes entre os estádios de desenvolvimento. Esses dados sugerem que as modificações no conteúdo de ácido graxo durante o desenvolvimento da semente nesses genótipos possam ser devidas ao controle pós-transcricional, como a alteração na atividade enzimática dependendo da condição fisiológica da célula.

Na análise entre os genótipos foi observado que em A29 e em N85-2176 a quantidade de transcrito do gene *GmFAD3A* foi praticamente nula. Para o gene *GmFAD3B* o menor nível de transcrito foi observado no genótipo A29. Para o gene *GmFAD3C* não foram observadas grandes mudanças no acúmulo de transcritos entre os genótipos analisados. Esses dados corroboram com os resultados observados para o perfil de ácidos observados na Figura 10.

O gene *GmFAD3A* tem sido associado ao loco *fan*, principal responsável pela biossíntese de ácido linolênico em sementes de soja. Pelo menos mais três locos independentes (*fan2*, *fan3*, e *fanx*) têm sido descritos como associados ao conteúdo de ácido linolênico em sementes, com efeitos menos significativos. Assim, os genes *GmFAD3B* e *GmFAD3C* provavelmente estão associados aos locos *fan2*, *fan3* e/ou *fanx* (BILYEU, 2003).

BYRUM (1997) identificou, por meio de *Southern blot*, deleções em genes de  $\omega$ -3-dessaturase de A5 e associou tais deleções ao alelo *fan(A5)*, o mesmo alelo presente no genótipo A29. O autor sugere que essa deleção não esteja nas regiões que flanqueiam o gene. No entanto, não se sabe se essa deleção é parcial ou completa. Para o alelo *fan2(A23)* nenhuma alteração foi observada.

O nível de transcrito do gene *GmFAD3A* em A29 foi praticamente nulo nos quatro estádios avaliados (Figura 15). O baixo nível de transcrito detectado indica que a deleção no alelo *fan(A5)* é parcial, e que esta pode provocar uma desestabilização do transcrito, resultando em níveis praticamente não detectáveis.

A redução do nível de transcrito para *GmFAD3B* também foi observada em A29 (Figura 15). Assim, estudos posteriores devem ser realizados para revelar os motivos que o alelo *fan2*(A23) leva ao menor acúmulo de transcrito, comparado a outros alelos presentes em outros genótipos. Já para *GmFAD3C* não foram observadas alterações no nível de transcrito. Dessa forma, a mutação no loco *fan3* possivelmente provoca alteração na estrutura da proteína de forma a influenciar a atividade enzimática da  $\omega$ -3-dessaturase, mas não reduzindo os níveis de transcritos desse gene.

Apesar de não serem conhecidos o tamanho e a localização da deleção no gene *GmFAD3A* em A29, alguns genótipos de soja possuem mutações bem caracterizadas na região codificante desse gene, alterando assim a estrutura e função da dessaturase. A PI361088B (3,8% de 18:3 $\Delta^{3,6,9}$ ) possui uma inserção de dois resíduos de timidina na posição 310, promovendo mudança do quadro de leitura e conseqüentemente o surgimento de um códon de parada prematuro na posição 328. A mutação em M5 (3,3% de 18:3 $\Delta^{3,6,9}$ ) é similar a de PI3661088B, apresentando também uma mudança no quadro de leitura, no entanto, neste caso ocorre uma deleção de 19 nucleotídeos na posição 1057, resultando em uma proteína com 25 resíduos de aminoácidos a mais na extremidade C-terminal. CX1512-44 (3% de 18:3 $\Delta^{3,6,9}$ ) apresenta uma mutação de apenas um par de bases na posição 811, exatamente no sítio de *splicing*, o que leva à formação de uma proteína com estrutura alterada. C1640 (3,7% de 18:3 $\Delta^{3,6,9}$ ) também contém uma mutação de troca de bases, mas esta encontra-se na região codificante, o códon para triptofano (TGG) no éxon 6 é modificado para um códon de parada (TGA) (CHAMPPELL, 2007). A caracterização dessas mutações tem sido importantes para o desenvolvimento de marcadores moleculares (BEUSELINCK, 2006; BILYEU, 2006; CHAMPPELL, 2007). Essa é uma ferramenta extremamente útil no melhoramento para a qualidade de óleo em soja, uma vez que fatores ambientais tem fortes efeitos sobre os conteúdos finais de ácidos graxos polinsaturados (LANNA, 2002; SILVA, 2007).

O genótipo N85-2176 representa a única fonte conhecida de soja que possui mutações que afetam tanto a atividade de  $\omega$ -6-dessaturase como a de  $\omega$ -3-dessaturase (WILSON, 2004). Esses genes são responsáveis pela aumento no conteúdo de ácido oléico para 35% (Figura 7) e redução no conteúdo de ácido linolênico para 3% (Figura 9). As mutações para  $\omega$ -3-desaturase foram relacionadas ao loco *fan* que carrega o gene *GmFAD3A*. No entanto, essa mutação não foi caracterizada e faltam estudos que comprovem alterações em outros locos. Os níveis de transcritos do gene *GmFAD3A*,

assim como em A29, foram praticamente nulos (Figura 15). Enquanto que para os genes *GmFAD3B* e *GmFAD3C* não foram observadas alterações.

Como A29 e N85-2176 não possuem ascendência genética comum, muito possivelmente as mutação presentes nos genes *GmFAD3A* desses dois genótipos sejam diferentes, o que indica distintos mecanismos de controle na expressão gênica. Estudos posteriores de caracterização da região promotora e identificação de possíveis regiões deletadas no genes das dessaturases devem ser realizados para o melhor entendimento dos mecanismos que provocam a redução do acúmulo de transcrito para esse gene em N85-2176.

A presença de outros genes que controlam o conteúdo de ácido linoléico/linolênico entre essas variedades não pode ser descartada. Análises moleculares de linhagens mutantes desenvolvidas no Japão identificaram quatro formas dos genes *FAD3*, *GmFAD3-1a*, *GmFAD3-1b*, *GmFAD3-2a*, e *GmFAD3-2b* (ANAI, 2005). Três deles mostraram-se equivalentes aos descritos anteriormente por BILYEU (2003). O gene *GmFAD3-1a* é equivalente *GmFAD3B*, *GmFAD3-1b* é equivalente a *GmFAD3A* e *GmFAD3-2a* é equivalente a *GmFAD3C*. Os perfis de acúmulo de transcritos desses genes foram avaliados por PCR semi-quantitativo que demonstrou que os transcritos do gene *GmFAD3-1a* não foram detectados nos estádios iniciais, os transcritos dos genes *GmFAD3-1b* e *GmFAD3-2a* foram detectados em todos os estádios, enquanto que os transcritos do gene *GmFAD3-2b* só foram detectados nos estádios iniciais do desenvolvimento da semente. Esses resultados evidenciam que a expressão desses genes é dependente do estágio de desenvolvimento do tecido. No entanto, eles contrariam os resultados obtidos neste trabalho. Uma possível hipótese para explicar essas diferenças é que a intensidade da alteração no acúmulo de transcrito esteja relacionada ao *background* genético, de forma a gerar resultados distintos dependendo do genótipo avaliado.

Em estudos envolvendo diferentes temperaturas de cultivo também têm sido observada a expressão diferencial dos genes *GmFAD3*. BYFIELD (2007) avaliou o efeito de três temperaturas (30/29°C, 26/22°C e 22/18°C) em três genótipos de soja (Dare, N99-3170 e N01-3544) nos níveis de transcritos dos genes *GmFAD3A*, *GmFAD3B*, e *GmFAD3C*. Em sementes com 35 dias após florescimento, o acúmulo de transcrito reduziu de 5 a 15 vezes para o gene *GmFAD3A*, 2 a 9 vezes para o gene *GmFAD3B* e 2 a 3 vezes para o gene *GmFAD3C* em sementes desenvolvidas em um ambiente quente (30/26°C) vs. ambientes normais (26/22°C) ou frios (22/18°C). As

reduções dos níveis de transcritos dos genes foram positivamente associadas à redução no conteúdo de ácido linolênico nas sementes dos três genótipos analisados. Deste modo, a regulação transcricional do gene da  $\omega$ -3-dessaturase, pelo menos em parte, explica as alterações na composição de ácidos graxos em diferentes temperaturas nos genótipos avaliados pelo autor.

## 6. CONCLUSÕES

- A composição de ácidos graxos variou durante a ontogenia da semente nas cultivares avaliadas. De modo geral, o conteúdo de ácido oléico aumentou com o desenvolvimento da semente, enquanto que o conteúdo de ácido linolênico reduziu.
- As elevadas concentrações de ácido oléico em FA22 e N85-2176 não são devido a alterações no níveis de transcritos dos genes *FAD2-1* e *FAD2-2*, evidenciando a presença de mecanismos de regulação pós-transcricional para essa característica, ou até mesmo o a participação de outros genes que influenciem no conteúdo desse de ácido graxo.
- Mutações em FA22 e N85-2176 na seqüência do gene *FAD2-1* podem ser responsáveis pela produção de mRNA truncados ou inativos, que embora sejam detectados com elevados níveis de transcritos, não influenciam na conversão do ácido oléico ao ácido linoléico.
- O baixo conteúdo de ácido linolênico em A29 é devido aos reduzidos níveis de transcritos dos genes *GmFAD3A* e *GmFAD3B*, enquanto que em N85-2176 a redução do nível de transcrito ocorre apenas no gene *GmFAD3A*.
- Mecanismos de regulação pós-transcricionais também devem existir, alterando a atividade de  $\omega$ -3-dessaturase codificada pelo *GmFAD3C*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIOVE Disponível em < <http://www.abiove.com.br/>> Acessado em 02/2008.
- ALONSO, D. L.; MAROTO, F. G. Plant as “chemical factories” for the production of polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 481-497, 2000.
- ALONSO, D. L.; MAROTO, F. G.; RUIZ, J. R.; GARRIDO, J. A.; VILCHES, M.A. Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.31, p. 1111–1124, 2003.
- ANAI, T.; YAMADA, T.; KINOSHITA, T.; RAHMAN, S. M.; TAKAGI, Y. Identification of corresponding genes for three low- $\alpha$ -linolenic acid mutants and elucidation of their contribution to fatty acid biosynthesis in soybean seed. **Plant Science**, v. 168, p. 1615–1623, 2005.
- ANDERSON, J. D.; BAKER, J. E. Deterioration of seeds during aging. **Phytopathology**, v. 73 (2), p. 321-325, 1983.
- BANILAS, G.; MORESSIS, A.; NIKOLOUDAKIS, N.; HATZOPOULOS, P. Spatial and temporal expressions of two distinct oleate desaturases from olive (*Olea europaea* L.). **Plant Science**, v. 168, p. 547–555, 2005.
- BEHROUZIAN, B.; FAUCONNOT, L; DALIGAULT, F.; NUGIER-CHAUVIN, C.; PATIN, H.; BUIST, P. H. Mechanism of fatty acid desaturation in the green alga *Chlorella vulgaris*. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 3545–3549, 2001.
- BELÓ, A.; ZHENG, P.; LUCK, S.; SHEN, B.; MEYER, D. J.; LI, B.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. Whole genome scan detects an allelic variant of *fad2* associated with increased oleic acid levels in maize. **Molecular Genetics and Genomics**, 2007.
- BEUSELINCK, P. R.; SLEPER, D. A.; BILYEU, K. D. An assessment of phenotype selection for linolenic acid using genetic markers. **Crop Science**, v. 46, p.747–750, 2006.
- BILYEU, K. D.; PALAVALLI, L.; SLEPER, D. A.; BEUSELINCK, P. R. Three microsomal omega-3 fatty-acid desaturase genes contribute. **Crop Science**, v. 43, p.1833–1838, 2003.

- BILYEU, K. D.; PALAVALLI, L.; SLEPER, D. A.; BEUSELINCK, P. R. Molecular genetic resources for development of 1% linolenic acid soybeans. **Crop Science**, v. 46, p. 1913-1918, 2006.
- BOZBAS, K. Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.12, p. 542–552, 2008.
- BROADWATER, J. A.; WHITTLE, E.; SHANKLIN, J. Desaturation and hydroxylation. Residues 148 and 324 of *Arabidopsis* FAD2, in addition to substrate chain length, exert a major influence in partitioning of catalytic specificity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277 p. 15613–15620, 2002.
- BROUN, P.; SHANKLIN, J.; WHITTLE, E.; SOMERVILLE, C. Catalytic plasticity of fatty acid modification enzymes underlying chemical diversity of plant lipids. **Science**, v. 282, p. 1315–1317, 1998.
- BROWSE, J.; KUNST, L.; ANDERSON, S.; HUGLY, S.; SOMERVILLE, C. R. A Mutant of *Arabidopsis* deficient in the chloroplast 16:1/18:1 desaturase. **Plant Physiology**, v. 90, p. 522–9, 1989.
- BROWSE, J.; MCCONN, M.; JAMES, D.; MIQUEL, M. Mutants of *Arabidopsis* deficient in the synthesis of alpha-linolenate. Biochemical and genetic characterization of the endoplasmic reticulum linoleoyl desaturase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 16345–16351, 1993.
- BUHR, T.; SATO, S.; EBRAHIM, F.; XING, A.; ZHOU, Y.; MATHIESEN, M.; SCHWEIGER, B.; KINNEY, A.; STASWICK, P. Ribozyme termination of RNA transcripts down-regulate seed fatty acid genes in transgenic soybean. **The Plant Journal**, v. 30, p. 155-63, 2002.
- BUIST, P. H.; BEHROUZIAN, B. Deciphering the cryptoregiochemistry of oleate  $\Delta$ -12-desaturase: A kinetic isotope effect study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, p. 871–876, 1998.
- BURTON, J. W.; WILSON, R. F.; BRIM, C. A.; RINNE, R. W. Registration of soybean germoplasm lines with modified fatty acid composition of seed oil. **Crop Science**, v. 29, p.1583, 1989.
- BYFIELD, G. E.; UPCHURCH, R. G. Effect of temperature on delta-9 stearyl-acp and

- microsomal omega-6 desaturase gene expression and fatty acid content in developing soybean seeds. **Crop Science**, v. 47, p. 1698-1704, 2007.
- BYRUM, J. R.; KINNEY, A. J.; STECCA, K.L.; GRACE, D.J.; DIERS, B.W. Alteration of the omega-3 fatty-acid desaturase gene is associated with reduced linolenic acid in the A5soybean genotype. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, p.356–359, 1997.
- CHAPMAN, K. D.; AUSTIN-BROWN, S.; SPARACE, S. A.; KINNEY, A. J.; RIPP, K. G.; PIRTLE, I. L.; PIRTLE R. M. Transgenic cotton plants with increased seed oleic acid content. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n°9, 2001.
- CHAPPELL, A. S.; BILYEU, K. D. The Low Linolenic Acid Soybean Line PI 361088B Contains a Novel GmFAD3A Mutation. **Crop Science**, v. 47, p. 1705-1710, 2007.
- CHEESBROUGH, T. M. Changes in the enzymes for fatty acid synthesis and desaturation during acclimation of developing soybean seeds to altered growth temperature. **Plant Physiology**, v. 90, p. 760-764, 1989.
- CHUNG, H. C.; YONG, J. Y.; DOH, H. K.; HYOUN, K. K.; DAE, S. C. Changes of lipid, protein, RNA and fatty acid composition in developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds. **Plant Science**, v. 109, p. 237-243, 1995.
- COROL Disponível em <<http://www.corol.com.br/curi2.htm>> Acessado em 02/2008.
- COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F. The utilization of used frying oil for the production of biodiesel. **Química Nova**, v. 23, p. 531-537, 2000.
- CREGAN, P.B.; A.A BHAGWAT; M.S. AKKAYA & R. JIANG. Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. **Methods Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 49-61, 1994.
- CRUZ, C. D. Programa GENES: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG. 442p. 1997.
- DAI, Q.; SHU, X. O.; JIN, F.; GAO, Y. T.; RUAN, Z. X.; ZHENG, W. Consumption of animal foods, cooking methods, and risk of breast cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 11, p. 801–808, 2002.

- DYER, J. M.; CHAPITAL, D. C.; KUAN, J. W.; MULLEN, R. T.; TURNER, C.; MCKEON, T. A.; PEPPERMAN, A. B. Molecular analysis of a bifunctional fatty acid conjugase/desaturase from tung. implications for the evolution of plant fatty acid diversity. **Plant Physiology**, v. 130, p. 2027-2038, 2002.
- EMBRAPA Disponível em <<http://www.embrapa.br/>> Acessado em 02/2008
- FEHR, W. R.; WELKE, G. A.; HAMMOND, E. G.; DUVICK, D. N.; CIANZIO, S. R. Inheritance of reduced linolenic acid content in soybean genotypes A16 and A17. **Crop Science**, v. 32, p. 903-906, 1992.
- GERMAN, J. B.; KINSELLA, J. E. Lipid oxidation in fish tissue. Enzymatic initiation via lipoxygenase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, p. 680-683, 1985.
- GESTEIRA, A. S., **Estudo da herança e de marcadores moleculares para teor de ácido linomlênico em soja**. Tese MS, UFV, Viçosa, MG, 50p. 1997.
- GIBSON, L. R.; MULLER, R. E. Influence of day and night temperature on soybean seed yiel. **Crop Science**, v. 36, p. 98-104, 1996.
- GINZIGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 503-512, 2002.
- GOOD-GOD, P. I. V. **Divergência genética e capacidade combinatória de cultivares de soja para teores de ácidos graxos**. Tese MS, UFV, Viçosa, MG, 67p. 2004.
- GRAEF, G. L.; FEHR, W. R.; MILLER, L. A. Inheritance of fatty acid composition in a soybean mutant with low linolenic acid. **Crop Science**, v. 28, p. 55- 58, 1988.
- HAMMOND, E. G.; FEHR, W. R.; SNYDR, H. E. Improving soybean quality by plant breeding. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 49, p. 33-35, 1972.
- HEPPARD, E. P.; KINNEY, A. J.; STECCA, K. L. and MIAO, G. H. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal  $\omega$ -6-desaturase genes in soybeans. **Journal Plant Physiology**, v. 110, p. 311-319, 1996.

- HU, F. B.; STAMPFER, M. J.; MANSON, J. E.; RIMM, E.; COLDITZ, G. A.; ROSNER, B. A.; HENNEKENS, C. H.; WILLETT, W. C. Dietary fat intake seed and the risk of coronary heart disease in women. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, p.1491–1499, 1997.
- HU, X.; SULLIVAN-GILBERT, M.; GUPTA, M.; THOMPSON, S. A. Mapping of the loci controlling oleic and linolenic acid contents and development of *fad2* and *fad3* allele-specific markers in canola (*Brassica napus* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, p. 497–507, 2006.
- HUANG, A. H. C. Oil bodies and oleosins in seeds. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 177-200, 1992.
- INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**; Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3° ed. São Paulo. v. 1, 533 p, 1985.
- JAWORSKI, J. G.; CLOUGH, R. C.; BARNUM, S. R. A cerulenin insensitive short chain 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase in *Spinacia oleracea* leaves. **Plant Physiology**, v. 90, p. 41-44, 1989.
- JHAM, G. N.; TELLES, F. F. F.; CAMPOS, L. G. Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. **Journal of the American oil Chemists Society**, v. 59, p. 132-133, 1982.
- KARGIOTIDOU, A.; DELI, D.; GALANOPOULOU, D.; TSAFTARIS, A.; FARMAKI, T. Low temperature and light regulate delta 12 fatty acid desaturases (*FAD2*) at a transcriptional level in cotton (*Gossypium hirsutum*). **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 2043-2056, 2008.
- KINNEY, A. J. Development of genetically engineered soybean oil for food applications. **Journal of Food Lipids**, v. 3, p. 273-292, 1996.
- LANA, A. C. **Efeito da temperatura sobre a regulação da síntese de ácidos graxos polinsaturados em soja**. Tese de Doutorado, UFV, Viçosa, MG, 84p. 2002.
- LI, L.; WANG, X.; GAI, J.; YU, D. Molecular cloning and characterization of a novel microsomal oleate desaturase gene from soybean. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1516-1526, 2007.

- LIMA, A. B. P. **Construção de cassete para a co-supressão do gene da oleil dessaturase e transformação genética de embriões somáticos de soja.** Tese de Doutorado, UFV, Viçosa, MG, 104p. 2005.
- LIU, Q.; SINGH, S. P.; GREEN, A. G. High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1732–1743, 2002.
- LIVAK, K. J. Analysis of relative expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOS, D. A.; MURATA, N. Structure and expression of fatty acid desaturases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1394, p. 3–15, 1998.
- MARTÍNEZ-RIVAS, J. M.; SPERLING, P.; LÜHS, W.; HEINZ, E. Spatial and temporal regulation of three different microsomal oleate desaturase genes (FAD2) from normal-type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Molecular Breeding**, v. 8, p. 159–168, 2001.
- MCCONN, M.; HUGLY, S.; SOMERVILLE, C.; BROWSE, J. A mutation at the *fad8* locus of *Arabidopsis* identifies a second chloroplast [omega]-3 Desaturase. **Plant Physiology**, v. 106, p. 1609–1614, 1994.
- MIQUEL, M.; BROWSE, J. *Arabidopsis* mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis. Biochemical and genetic characterization of a plant oleoyl-phosphatidylcholine desaturase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 1502–1509, 1992.
- MONTEIRO, M. R. P.; MOREIRA, M. A.; COSTA, N.M.B; OLIVEIRA, M. G. A; PIRES, C. V. Avaliação da digestibilidade protéica de genótipos de soja com ausência e presença do inibidor de tripsina Kunitz e lipoxigenases. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n.1, p. 99-107, 2003.
- MOORE T. S. Lipid metabolism in plants. **Boca Raton: CRC Press**, 1993. 350p.
- MURPHY, D. J. Structure, function, and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. **Progress in Lipid Research**, v. 32, p. 247-280 , 1993.
- OHLROGGE, J.; BROWSE, J. Lipid biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 957-970, 1995.

- OKULEY, J.; LIGHTNER, J.; FELDMANN, K.; YADAV, N.; LARK, E.; BROWSEAI, J. Arabidopsis FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. **The Plant Cell**, v. 6, p. 147-158, 1994.
- OLIVA, M. L.; SHANNON, J. G.; SLEPER, D. A.; ELLERSIECK, M. R.; CARDINAL, A. J.; PARIS, R. L.; LEE, J. D. Stability of fatty acid profile in soybean genotypes with modified seed oil composition. **Crop Science**, v. 46, p. 2069–2075, 2006.
- PATEL, M.; JUNG, S.; MOORE, K.; POWELL, G.; AINSWORTH, C.; ABBOTT, A. High-oleate peanut mutants result from a MITE insertion into the FAD2 gene. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 1492–1502, 2004.
- PORTAL DO BIODIESEL Disponível em <[www.biodiesel.gov.br/](http://www.biodiesel.gov.br/)> Acessado em 02/2008.
- RAHMAM, S. M.; TAKAGI, Y. Inheritance of high oleic acid content in the seed oil of soybean mutant M23. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, p. 179-182, 1996.
- RENNIE, B. D.; TANNER, J. W. New allele at the Fan locus in the soybean line A5. **Crop Science**, v. 31, p. 297,-301, 1991.
- ROSS, A. J.; FEHR, W. R. ; WELKE, G. A.; CIANZIO, S. R. Agronomic and seed traits of 1%-linolenate soybean genotypes. **Crop Science**, v. 40, p. 383-386, 2000.
- SCHLUETER, J. A.; VASYLENKO-SANDERS, I. F.; DESHPANDE, S.; YI, J.; SIEGFRIED, M.; ROE, B. A.; SCHLUETER, S. D.; SCHEFFLER, B. E.; SHOEMAKER, R. C. The FAD2 Gene Family of Soybean: Insights into the Structural and Functional Divergence of a Paleopolyploid. **Genome The Plant Genome [A Supplement to Crop Science]**, n° 1, January 2007.
- SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? **Química Nova**, v. 24, p. 247-251, 2001.
- SHANKLIN, J.; CAHOON, E. B. Desaturation and related modifications of fatty acids. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 611–641, 1998.

- SILVA, D. F.; PINTO, M. O.; GOD, P. I. G.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Interação genótipo x ambiente para teores de ácidos graxos em variedades de soja. **In.: VII SIMPOS – Universidade Federal de Viçosa- UFV**, Novembro de 2007.
- STOUTJESDIJK, P. A.; HURLESTONE, C.; SINGH, S. P.; GREEN, A. G. High-oleic acid Australian *Brassica napus* and *B. juncea* varieties produced by co-suppression of endogenous delta-12-desaturases. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, p. 938–940, 2000.
- TANG, G. Q.; NOVITZKY, W. P. ; GRIFFIN, H. C.; HUBER, S. C.; DEWEY, R. E. Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation. **The Plant Journal**, v. 44, p. 433–446, 2005.
- VAN DE LOO, F. J.; BROUN, P.; TURNER, S.; SOMERVILLE, C. An oleate 12-hydroxylase from *Ricinus communis* L. is a fatty acyl desaturase homolog. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 6743–6747, 1995.
- WALLIS, J. G.; BROWSE, J. Mutants of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids. **Progress in Lipid Research**, v. 41, p. 254–278, 2002.
- WANG, X. M.; HILDERBRAND, D. F. Biosynthesis and regulation of linolenic acid in higher plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 26, p. 777-792, 1988.
- WILCOX, J. R.; CAVINS, J. F.; NIELSEN, N. C. Genetic alteration of soybean oil composition by a chemical mutagen. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 61, p. 97-100, 1984.
- WILSON, R. F. Seed composition. In BOERMA, H. R. and SPECHT, J. E. **Soybeans: Improvement, production, and uses**. 3rd ed. Agronomy n° 16. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI, p. 621–677, 2004.
- YADAV, N. S. Genetic modification of soybean oil quality. In: Verma, D. P. S.; SHOEMAKER, R. C. (Eds.). Soybean genetics, molecular biology and biotechnology. **USA: CAB INTERNATIONAL, WALLINGFORD, CT**, p. 127-188, 1996.

## **APÊNDICE**

**Quadro A** – Análise de variância para a concentração de ácido oléico e desdobramento da interação Genótipo (G) x Estádio de Desenvolvimento (ED).

<b>Fontes de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
G	3	4362,48	12,58	0,00051
ED	4	1378,44	196,25	0
G*ED	12	346,65	49,35	0
G/ED	15	1149,82	163,70	0
G/1°ED	3	32,6041	4,64	0,004442
G/2°ED	3	674,21	95,98	0
G/3°ED	3	1447,49	206,08	0
G/4°ED	3	2350,97	334,71	0
G/5°ED	3	1243,83	177,08	0
ED/G	16	604,60	86,07	0
ED/FA22	4	1208,33	172,03	0
ED/A29	4	32,2614	4,59	0,0019
ED/N5-2176	4	1155,78	164,55	0
ED/Tucunaré	4	22,03	3,13	0,01782
Resíduo	100	7,02		

**Quadro B** – Análise de variância para a concentração de ácido linoléico e desdobramento da interação Genótipo (G) x Estádio de Desenvolvimento (ED).

<b>Fontes de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>F</b>	<b>Pr&gt;F</b>
G	3	5162,13	5162,13	0,00005
ED	4	273,18	273,18	0
G*ED	12	245,51	245,51	0
G/ED	15	1228,84	1228,84	0
G/1°ED	3	522,30	522,30	0
G/2°ED	3	955,19	955,19	0
G/3°ED	3	1417,10	1417,10	0
G/4°ED	3	2072,96	2072,96	0
G/5°ED	3	1176,62	1176,62	0
ED/G	16	252,43	252,43	0
ED/FA22	4	244,58	244,58	0
ED/A29	4	10,98	10,98	0,16976
ED/N5-2176	4	603,56	90,15	0
ED/Tucunaré	4	150,60	22,49	0
Resíduo	100	6,69		

**Quadro C** – Análise de variância para a concentração de ácido linolênico e desdobramento da interação Genótipo (G) x Estádio de Desenvolvimento (ED).

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	F	Pr>F
G	3	474,96	17,69	0,00011
ED	4	278,05	329,77	0
G*ED	12	26,83	31,82	0
G/ED	15	116,46	138,12	0
G/1°ED	3	321,40	381,18	0
G/2°ED	3	107,56	127,56	0
G/3°ED	3	70,76	83,92	0
G/4°ED	3	40,19	47,67	0
G/5°ED	3	42,38	50,27	0
ED/G	16	89,64	106,31	0
ED/FA22	4	191,93	227,63	0
ED/A29	4	2,81	3,34	0,01302
ED/N5-2176	4	61,82	73,32	0
ED/Tucunaré	4	101,98	120,95	0
Resíduo	100	0,84		

**Quadro D** – Concentrações médias de ácido oléico na fração óleo para os genótipos de soja Tucunaré, A29, N85-2176 e FA22 em cinco estádios de desenvolvimento.

Genótipo	1° Estádio	2° Estádio	3° Estádio	4° Estádio	5° Estádio
Tucunaré	19,25 <sup>B,ab</sup>	20,80 <sup>AB,b</sup>	20,06 <sup>AB,c</sup>	23,87 <sup>A,c</sup>	19,24 <sup>B,c</sup>
A29	17,59 <sup>C,b</sup>	20,63 <sup>ABC,b</sup>	23,19 <sup>A,c</sup>	22,11 <sup>AB,c</sup>	18,71 <sup>BC,c</sup>
N85-2176	19,24 <sup>D,ab</sup>	22,56 <sup>D,b</sup>	37,65 <sup>B,b</sup>	54,15 <sup>A,b</sup>	31,21 <sup>C,b</sup>
FA22	23,09 <sup>E,a</sup>	42,46 <sup>D,a</sup>	53,99 <sup>B,a</sup>	59,88 <sup>A,a</sup>	49,44 <sup>C,a</sup>

\* Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

\*\* Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**Quadro E** – Concentrações médias de ácido linoléico na fração óleo para os cultivares Tucunaré, A29, N85-2176 e FA22 nos cinco estádios de desenvolvimento.

Genótipo	1° Estádio	2° Estádio	3° Estádio	4° Estádio	5° Estádio
Tucunaré	46,52 <sup>B,c</sup>	54,38 <sup>A,b</sup>	58,41 <sup>A,b</sup>	57,25 <sup>A,b</sup>	58,39 <sup>A,b</sup>
A29	62,73 <sup>A,a</sup>	63,20 <sup>A,a</sup>	62,40 <sup>A,a</sup>	63,61 <sup>A,a</sup>	65,83 <sup>A,a</sup>
N85-2176	54,07 <sup>B,b</sup>	60,00 <sup>A,a</sup>	48,43 <sup>C,c</sup>	33,44 <sup>D,c</sup>	53,04 <sup>B,c</sup>
FA22	41,29 <sup>A,d</sup>	35,04 <sup>B,c</sup>	28,01 <sup>C,d</sup>	24,83 <sup>C,d</sup>	33,12 <sup>B,d</sup>

\* Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

\*\* Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**Quadro F** – Concentrações médias de ácido linolênico na fração óleo para os cultivares Tucunaré, A29, N85-2176 e FA22 nos cinco estádios de desenvolvimento.

Genótipo	1° Estádio	2° Estádio	3° Estádio	4° Estádio	5° Estádio
Tucunaré	17,00 <sup>A,b</sup>	10,61 <sup>B,a</sup>	8,53 <sup>C,a</sup>	6,70 <sup>D,a</sup>	7,63 <sup>CD,a</sup>
A29	2,58 <sup>A,d</sup>	1,29 <sup>AB,c</sup>	0,92 <sup>B,d</sup>	0,93 <sup>B,c</sup>	1,26 <sup>AB,c</sup>
N85-2176	10,74 <sup>A,c</sup>	5,40 <sup>B,b</sup>	3,62 <sup>C,c</sup>	2,87 <sup>C,b</sup>	3,61 <sup>C,b</sup>
FA22	18,76 <sup>A,a</sup>	9,44 <sup>B,a</sup>	7,08 <sup>C,b</sup>	5,45 <sup>D,a</sup>	4,96 <sup>D,b</sup>

\* Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

\*\* Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**Quadro G** – Quantificação relativa dos transcritos do gene *FAD2-1*

AMOSTRA	Corrida	Ct <i>FAD2-1</i>	Média Ct <i>FAD2-1</i>	SD <i>FAD2-1</i>	Ct <i>GAPDH</i>	Média Ct <i>GAPDH</i>	SD <i>GAPDH</i>	$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	QR	SD QR/Corrida	QR Geral	SD Geral
N85-2176 1° estádio	1	21,696	21,456	0,339	19,014	19,007	0,010	2,449	0,240	0,212051	0,182165	0,138556	0,103938
		21,216			19,000						0,246841		
	2	25,388	25,474	0,122	21,207	21,159	0,068	4,315	0,098	0,065062	0,061129	0,069248	
		25,560			21,111								
N85-2176 2° estádio	1	19,299	19,104	0,275	18,331	18,355	0,033	0,749	0,196	0,622205	0,549595	0,524710	0,137880
		18,910			18,378						0,704408		
	2	20,458	20,497	0,055	19,115	19,154	0,055	1,343	0,055	0,427214	0,412615	0,442329	
		20,535			19,193								
N85-2176 3° estádio	1	19,325	19,173	0,215	18,593	18,679	0,121	0,495	0,174	0,731035	0,654622	0,633316	0,138195
		19,022			18,764						0,816366		
	2	20,266	20,184	0,115	19,246	19,198	0,068	0,986	0,095	0,535597	0,504405	0,568718	
		20,103			19,150								
N85-2176 4° estádio	1	20,326	20,436	0,156	19,335	19,625	0,410	0,811	0,532	0,598269	0,598269	0,910576	0,441669
		20,547			19,915						0,598269		
	2	20,157	20,490	0,470	19,735	20,807	1,517	-0,318	1,123	1,222883	0,600607	2,489886	
		20,822			21,880								
Tucunaré 1° estádio	1	20,812	20,817	0,007	19,273	19,360	0,123	1,457	0,087	0,397486	0,376197	0,387914	0,013537
		20,822			19,447						0,419980		
	2	22,587	22,579	0,011	21,044	21,044		1,535	0,008	0,378342	0,376406	0,380288	
		22,571			#								
Tucunaré 2° estádio	1	22,039	22,173	0,189	21,423	21,325	0,139	0,848	0,166	0,584415	0,526173	0,601728	0,024485
		22,306			21,226						0,649104		
	2	20,934	21,053	0,168	20,260	20,296	0,050	0,757	0,124	0,619042	0,572256	0,669652	
		21,172			20,331								

**Quadro G – Continuação...**

AMOSTRA	Corrida	Ct <i>FAD2-1</i>	Média Ct <i>FAD2-1</i>	SD <i>FAD2-1</i>	Ct <i>GAPDH</i>	Média Ct <i>GAPDH</i>	SD <i>GAPDH</i>	$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	QR	SD QR/Corrida	QR Geral	SD Geral
Tucunaré 3° estádio	1	22,689	22,638	0,072	20,750	20,659	0,130	1,980	0,105	0,285442	0,267118	0,229937	0,078496
		22,588			20,567						0,305023		
	2	26,850	26,824	0,036	24,024	24,067	0,060	2,758	0,050	0,174433	0,169049		
		26,799			24,109						0,179988		
Tucunaré 4° estádio	1	20,116	20,248	0,188	18,620	18,638	0,026	1,610	0,327	0,360748	0,293259	0,313783	0,066418
		20,381			18,657						0,443768		
	2	23,612	23,771	0,225	21,684	21,685	0,001	2,086	0,159	0,266818	0,241269		
		23,930			21,685						0,295073		
A29 1° estádio	1	22,802	23,187	0,544	20,096	20,063	0,046	3,124	0,386	0,138278	0,108276	0,082968	0,078221
		23,572			20,030						0,176593		
	2	26,501	26,566	0,091	21,039	20,900	0,197	5,666	0,153	0,027657	0,025099		
		26,630			20,761						0,030476		
A29 2° estádio	1	18,474	18,601	0,180	17,604	17,804	0,283	0,797	0,237	0,603654	0,519406	0,463423	0,198316
		18,729			18,005						0,701567		
	2	21,043	21,011	0,045	19,150	19,227	0,109	1,784	0,084	0,323193	0,306532		
		20,979			19,304						0,340759		
A29 3° estádio	1	18,985	18,831	0,218	18,510	18,543	0,047	0,288	0,157	0,833053	0,753985	0,703699	0,182935
		18,677			18,576						0,920414		
	2	21,027	21,000	0,039	20,159	20,124	0,049	0,876	0,044	0,574344	0,558539		
		20,972			20,090						0,590596		
A29 4° estádio	1	19,897	19,715	0,258	19,375	19,340	0,049	0,374	0,392	0,788875	0,615646	0,731860	0,080631
		19,533			19,306						1,010846		
	2	19,940	19,889	0,073	19,254	19,268	0,019	0,621	0,053	0,674845	0,652511		
		19,838			19,282						0,697943		

## Quadro G – Continuação...

AMOSTRA	Corrida	Ct <i>FAD2-1</i>	Média Ct <i>FAD2-1</i>	SD <i>FAD2-1</i>	Ct <i>GAPDH</i>	Média Ct <i>GAPDH</i>	SD <i>GAPDH</i>	$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	QR	SD QR/Corrida	QR eral	SD Geral
FA22 1° estádio	1	22,580	22,715	0,191	18,354	18,403	0,068	4,312	0,144	0,065167	0,059503	0,056851	0,011761
		22,850			18,451						0,071369		
	2	24,799	24,721	0,111	19,897	19,943	0,066	4,778	0,091	0,048534	0,045814	0,051416	
		24,643			19,990								
FA22 2° estádio	1	17,943	17,963	0,028	17,005	16,958	0,066	1,005	0,051	0,529125	0,512357	0,536884	0,010973
		17,983			16,911						0,546442		
	2	18,803	18,679	0,177	17,643	17,719	0,108	0,960	0,146	0,544644	0,496426	0,597545	
		18,554			17,795								
FA22 3° estádio	1	19,299	19,272	0,039	18,385	18,386	0,001	0,886	0,028	0,570664	0,560735	0,531189	0,055827
		19,244			18,387						0,580770		
	2	19,910	19,907	0,004	18,847	18,786	0,086	1,121	0,061	0,491713	0,473045	0,511118	
		19,904			18,725								
FA22 4° estádio	1	20,771	20,920	0,211	20,562	20,143	0,593	0,777	0,634	0,611309	0,409235	0,514388	0,137068
		21,069			19,724						0,913165		
	2	21,555	21,597	0,059	20,241	20,217	0,033	1,380	0,048	0,417466	0,405057	0,430256	
		21,638			20,193								

# Dado perdido

Ct = Ciclo Threshold

SD = Desvio Padrão

$\Delta$  Ct = Ct do gene alvo – Ct do GAPDH

QR = Quantificação Relativa

**Quadro H –** Quantificação relativa dos transcritos do gene *FAD2-2*

AMOSTRA	Corrida	Ct <i>FAD2-2</i>	Média Ct <i>FAD2-2</i>	SD <i>FAD2-2</i>	Ct <i>GAPDH</i>	Média Ct <i>GAPDH</i>	SD <i>GAPDH</i>	$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	QR	SD QR/Corrida	QR Geral	SD Geral
N85-2176 1° estádio	1	25,133	25,046	0,123	20,384	20,328	0,080	4,718	0,104	0,050729	0,047512	0,055289	0,006449
		24,959			20,271						0,054163		
	2	25,588	25,753	0,233	21,278	21,297	0,027	4,456	0,166	0,059849	0,053886	0,066473	
N85-2176 2° estádio	1	24,097	24,094	0,005	19,249	19,299	0,070	4,795	0,049	0,048318	0,046833	0,034916	0,018954
		24,090			19,348						0,049851		
	2	25,406	25,358	0,068	19,149	19,282	0,188	6,076	0,142	0,021513	0,019671	0,023527	
N85-2176 3° estádio	1	25,018	24,825	0,274	20,022	20,099	0,109	4,726	0,209	0,050484	0,044252	0,043666	0,009643
		24,631			20,176						0,057595		
	2	24,898	24,736	0,229	19,473	19,512	0,055	5,224	0,166	0,036848	0,033170	0,040934	
N85-2176 4° estádio	1	25,519	25,849	0,467	20,817	21,101	0,402	4,748	0,659	0,049778	0,049778	0,033777	0,022630
		26,179			21,386						0,049778		
	2	25,163	25,918	1,068	20,113	19,541	0,810	6,378	0,948	0,017775	0,009767	0,032350	
Tucunaré 1° estádio	1	24,313	24,409	0,136	20,678	20,689	0,016	3,720	0,097	0,095308	0,089660	0,082153	0,018605
		24,505			20,701						0,101313		
	2	25,241	25,391	0,213	21,126	21,160	0,048	4,231	0,155	0,068997	0,062576	0,076077	
Tucunaré 2° estádio	1	26,694	26,828	0,190	22,525	22,539	0,020	4,289	0,135	0,066516	0,061070	0,045671	0,029479
		26,963			22,553						0,072449		
	2	26,288	26,261	0,038	20,412	20,412	0,000	5,849	0,027	0,024826	0,024412	0,025248	

**Quadro H – Continuação...**

AMOSTRA	Corrida	Ct FAD2-2	Média Ct FAD2-2	SD FAD2-2	Ct GAPDH	Média Ct GAPDH	SD GAPDH	Δ Ct	SD Δ Ct	QR	SD QR/Corrida	QR Geral	SD Geral
Tucunaré 3° estádio	1	26,531	26,408	0,175	21,825	21,749	0,107	4,659	0,145	0,052668	0,048061	0,048708	0,005600
		26,284			21,673						0,057716		
	2	29,365	29,234	0,185	24,376	24,317	0,083	4,917	0,143	0,044748	0,040875		
		29,103			24,259						0,048987		
Tucunaré 4° estádio	1	24,477	24,768	0,412	20,146	19,947	0,282	4,821	0,589	0,047524	0,032752	0,040965	0,009275
		25,059			19,747						0,068958		
	2	27,152	27,151	0,002	21,889	21,818	0,100	5,332	0,071	0,034407	0,032907		
		27,150			21,748						0,035976		
A29 1° estádio	1	24,311	24,379	0,095	21,529	21,535	0,007	2,844	0,067	0,165778	0,158860	0,131441	0,048559
		24,446			21,540						0,172997		
	2	24,266	24,355	0,126	20,550	20,664	0,161	3,691	0,145	0,097105	0,088614		
		24,444			20,778						0,106409		
A29 2° estádio	1	22,827	22,854	0,038	18,726	18,690	0,051	4,164	0,045	0,071979	0,069967	0,061484	0,014842
		22,881			18,654						0,074049		
	2	24,069	24,044	0,036	19,227	19,334	0,151	4,710	0,110	0,050989	0,047563		
		24,018			19,441						0,054662		
A29 3° estádio	1	24,108	23,946	0,228	20,076	20,097	0,030	3,849	0,163	0,087853	0,079260	0,071573	0,023024
		23,785			20,119						0,097378		
	2	24,930	24,941	0,016	20,312	20,359	0,066	4,582	0,048	0,055292	0,053650		
		24,952			20,405						0,056984		
A29 4° estádio	1	24,403	24,334	0,099	20,579	20,558	0,030	3,776	0,254	0,092024	0,078385	0,077545	0,020476
		24,264			20,537						0,108036		
	2	23,733	23,655	0,110	19,211	19,282	0,101	4,374	0,105	0,063066	0,058999		
		23,578			19,353						0,067413		

**Quadro H – Continuação...**

AMOSTRA	Corrida	Ct <i>FAD2-2</i>	Média Ct <i>FAD2-2</i>	SD <i>FAD2-2</i>	Ct <i>GAPDH</i>	Média Ct <i>GAPDH</i>	SD <i>GAPDH</i>	$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	QR	SD QR/Corrida	QR Geral	SD Geral
FA22 1º estádio	1	24,046	24,115	0,098	19,833	19,937	0,148	4,178	0,125	0,071376	0,065942	0,051118	0,028650
		24,184									0,077259		
	2	25,459	25,540	0,114	19,898	20,035	0,194	5,505	0,159	0,030859	0,027907	0,034123	
		25,621									0,034123		
FA22 2º estádio	1	22,172	22,175	0,005	17,744	17,788	0,062	4,387	0,044	0,062517	0,060795	0,053894	0,012193
		22,178									0,064286		
	2	22,759	22,713	0,064	17,804	17,815	0,016	4,898	0,046	0,045272	0,043963	0,046620	
		22,668									0,046620		
FA22 3º estádio	1	24,271	24,231	0,056	19,063	19,007	0,079	5,225	0,068	0,036836	0,035276	0,042817	0,008459
		24,192									0,038465		
	2	23,750	23,710	0,056	18,955	18,931	0,034	4,779	0,046	0,048799	0,047396	0,050243	
		23,671									0,050243		
FA22 4º estádio	1	26,549	26,522	0,038	20,753	20,720	0,047	5,802	0,206	0,025570	0,022450	0,025550	0,000028
		26,495									0,029122		
	2	26,252	26,144	0,153	20,323	20,339	0,022	5,805	0,109	0,025530	0,023829	0,027353	
		26,036									0,027353		

Ct = Ciclo Threshold

SD = Desvio Padrão

$\Delta$  Ct = Ct do gene alvo – Ct do GAPDH

QR = Quantificação Relativa

**Quadro I –** Quantificação relativa dos transcritos do gene *GmFAD3A*

AMOSTRA	Corrida	Ct <i>GmFAD3A</i>	Média Ct <i>GmFAD3A</i>	SD <i>GmFAD3A</i>	Ct <i>GAPDH</i>	Média Ct <i>GAPDH</i>	SD <i>GAPDH</i>	$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	QR	SD QR/Corrida	QR Geral	SD Geral
N85-2176 1° estádio	1	31,173	30,917	0,362	20,024	19,957	0,094	10,959	0,265	0,000643	0,000538	0,000580	0,000089
		30,661			19,890						0,000767		
	2	32,717	32,367	0,495	21,112	21,081	0,044	11,286	0,352	0,000516	0,000408	0,000654	
		32,016			21,050								
N85-2176 2° estádio	1	29,848	29,690	0,224	19,287	19,299	0,016	10,391	0,159	0,000941	0,000846	0,000596	0,000488
		29,531			19,310						0,001047		
	2	31,593	31,588	0,006	19,229	19,223	0,008	12,365	0,007	0,000250	0,000249	0,000252	
		31,584			19,218								
N85-2176 3° estádio	1	30,304	30,218	0,122	19,934	20,064	0,184	10,154	0,156	0,001103	0,000993	0,000793	0,000438
		30,132			20,194						0,001225		
	2	30,947	30,519	0,606	19,141	19,134	0,010	11,385	0,429	0,000483	0,000362	0,000644	
		30,090			19,126								
N85-2176 4° estádio	1	31,866	31,866		21,686	21,686		10,181	0,000	0,001083	0,001083	0,001009	0,000106
		#			#						0,001083		
	2	30,585	30,694	0,154	19,795	20,291	0,702	10,402	0,508	0,000934	0,000664	0,001313	
		30,802			20,788								
Tucunaré 1° estádio	1	25,715	25,806	0,129	21,198	21,223	0,035	4,584	0,094	0,046229	0,043395	0,040002	0,008807
		25,898			21,247						0,049249		
	2	26,431	26,363	0,097	21,283	21,311	0,039	5,052	0,074	0,033775	0,032145	0,035487	
		26,294			21,338								
Tucunaré 2° estádio	1	27,249	27,048	0,284	22,566	22,471	0,135	4,577	0,222	0,046452	0,040018	0,035121	0,016024
		26,847			22,376						0,053919		
	2	25,664	25,861	0,279	20,236	20,287	0,072	5,574	0,204	0,023790	0,020751	0,027274	
		26,059			20,338								

**Quadro I – Continuação...**

AMOSTRA	Corrida	Ct GmFAD3A	Média Ct GmFAD3A	SD GmFAD3A	Ct GAPDH	Média Ct GAPDH	SD GAPDH	Δ Ct	SD Δ Ct	QR	SD QR/Corrida	QR Geral	SD Geral
Tucunaré 3º estádio	1	26,039	26,103	0,090	21,495	21,435	0,085	4,669	0,088	0,043678	0,041177	0,036533	0,010105
		26,167			21,374						0,046331		
	2	29,632	29,754	0,172	24,482	24,494	0,017	5,259	0,122	0,029387	0,027075	0,031897	
		29,875			24,506								
Tucunaré 4º estádio	1	24,974	25,049	0,106	20,206	20,016	0,268	5,033	0,433	0,034206	0,025587	0,032531	0,002368
		25,124			19,826						0,045728		
	2	26,976	27,131	0,219	21,891	21,944	0,076	5,187	0,164	0,030857	0,027638	0,034450	
		27,286			21,998								
A29 1º estádio	1	34,600	34,336	0,374	21,042	20,992	0,071	13,344	0,269	0,000130	0,000108	0,000072	0,000082
		34,072			20,942						0,000156		
	2	40,000	37,702	3,250	20,995	20,995	0,001	16,707	2,298	0,000014	0,000003	0,000064	
		35,404			20,994								
A29 2º estádio	1	34,850	34,332	0,733	18,258	18,265	0,010	16,066	0,518	0,000021	0,000015	0,000011	0,000014
		33,813			18,273						0,000030		
	2	40,000	40,000	0,000	19,174	19,246	0,103	20,754	0,073	0,000001	0,000001	0,000001	
		40,000			19,319								
A29 3º estádio	1	33,508	33,813	0,431	19,906	19,675	0,328	14,138	0,383	0,000076	0,000059	0,000044	0,000046
		34,117			19,443						0,000099		
	2	37,395	37,186	0,295	20,214	20,163	0,072	17,024	0,215	0,000011	0,000010	0,000013	
		36,978			20,112								
A29 4º estádio	1	30,856	30,690	0,235	20,631	20,558	0,104	10,132	0,412	0,001119	0,000849	0,000560	0,000791
		30,524			20,484						0,001475		
	2	40,000	40,000	0,000	19,271	19,242	0,041	20,758	0,029	0,000001	0,000001	0,000001	
		40,000			19,214								

**Quadro I – Continuação...**

AMOSTRA	Corrida	Ct GmFAD3A	Média Ct GmFAD3A	SD GmFAD3A	Ct GAPDH	Média Ct GAPDH	SD GAPDH	$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	QR	SD QR/Corrida	QR Geral	SD Geral
FA22 1º estágio	1	26,001	26,148	0,208	19,310	19,381	0,099	6,768	0,163	0,010687	0,009581	0,009445	0,001756
		26,295			19,451								
	2	27,260	27,188	0,102	19,950	20,026	0,107	7,162	0,104	0,008204	0,007649		
		27,116			20,101								
FA22 2º estágio	1	22,129	22,083	0,065	17,759	17,692	0,094	4,391	0,081	0,052614	0,049828	0,046583	0,008530
		22,037			17,625								
	2	22,958	22,820	0,194	18,080	18,041	0,055	4,779	0,143	0,040551	0,036855		
		22,683			18,003								
FA22 3º estágio	1	23,878	24,169	0,411	19,150	19,074	0,107	5,094	0,300	0,032825	0,026841	0,037001	0,005905
		24,459			18,998								
	2	24,135	24,129	0,008	19,493	19,373	0,169	4,756	0,120	0,041176	0,037996		
		24,124			19,253								
FA22 4º estágio	1	26,369	26,258	0,157	20,142	20,062	0,113	6,196	0,367	0,015679	0,012255	0,013773	0,002695
		26,148			19,982								
	2	26,941	26,680	0,369	20,258	20,069	0,268	6,612	0,322	0,011867	0,009560		
		26,419			19,879								

# Dado perdido

Ct = Ciclo Threshold

SD = Desvio Padrão

$\Delta$  Ct = Ct do gene alvo – Ct do GAPDH

QR = Quantificação Relativa

**Quadro J –** Quantificação relativa dos transcritos do gene *GmFAD3B*

AMOSTRA	Corrida	Ct <i>GmFAD3B</i>	Média Ct <i>GmFAD3B</i>	SD <i>GmFAD3B</i>	Ct <i>GAPDH</i>	Média Ct <i>GAPDH</i>	SD <i>GAPDH</i>	$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	QR	SD QR/Corrida	QR Geral	SD Geral
N85-2176 1° estádio	1	26,308	26,311	0,004	20,427	20,456	0,040	5,855	0,029	0,019090	0,018724	0,017951	0,001610
		26,314			20,484						0,019462		
	2	27,040	26,879	0,228	20,810	20,836	0,036	6,043	0,164	0,016813	0,015052	0,018779	
		26,717			20,861								
N85-2176 2° estádio	1	25,939	25,671	0,380	19,699	19,691	0,011	5,979	0,268	0,017550	0,014637	0,016367	0,001672
		25,402			19,683						0,021042		
	2	25,225	25,185	0,056	19,040	18,992	0,068	6,194	0,062	0,015185	0,014556	0,015840	
		25,146			18,943								
N85-2176 3° estádio	1	26,680	26,350	0,467	20,318	20,273	0,064	6,077	0,333	0,016429	0,013116	0,016605	0,000249
		26,020			20,228						0,020578		
	2	25,301	25,090	0,298	18,955	19,044	0,126	6,046	0,229	0,016781	0,014372	0,019593	
		24,879			19,133								
N85-2176 4° estádio	1	27,283	27,280	0,004	21,243	21,502	0,366	5,778	0,430	0,020105	0,020105	0,024565	0,006308
		27,277			21,761						0,020105		
	2	25,216	25,259	0,060	19,810	20,023	0,302	5,235	0,218	0,029026	0,025051	0,033632	
		25,301			20,237								
Tucunaré 1° estádio	1	26,769	26,756	0,019	21,146	21,065	0,114	5,691	0,082	0,021331	0,020180	0,025968	0,006558
		26,742			20,984						0,022547		
	2	26,149	26,144	0,008	20,938	20,987	0,069	5,157	0,049	0,030606	0,029609	0,031637	
		26,138			21,035								
Tucunaré 2° estádio	1	28,432	28,370	0,087	22,959	22,728	0,327	5,642	0,239	0,022049	0,018758	0,020484	0,002214
		28,308			22,497						0,025918		
	2	25,908	25,943	0,050	20,098	20,075	0,032	5,868	0,042	0,018918	0,018389	0,019462	
		25,978			20,052								

**Quadro J – Continuação...**

AMOSTRA	Corrida	Ct GmFAD3B	Média Ct GmFAD3B	SD GmFAD3B	Ct GAPDH	Média Ct GAPDH	SD GAPDH	Δ Ct	SD Δ Ct	QR	SD QR/Corrida	QR Geral	SD Geral
Tucunaré 3º estádio	1	28,074	27,992	0,116	21,871	21,794	0,109	6,198	0,112	0,015142	0,014037	0,017782	0,003734
		27,910			21,718						0,016335		
	2	29,733	29,937	0,288	24,294	24,181	0,159	5,755	0,232	0,020422	0,017452		
		30,140			24,069						0,023898		
Tucunaré 4º estádio	1	26,119	26,208	0,127	20,198	20,143	0,078	6,065	0,320	0,016561	0,013337	0,016292	0,000380
		26,298			20,087						0,020563		
	2	27,752	27,860	0,153	21,694	21,745	0,073	6,114	0,120	0,016023	0,014779		
		27,967			21,797						0,017372		
A29 1º estádio	1	29,609	29,652	0,060	21,387	21,346	0,058	8,306	0,059	0,003641	0,003498	0,005516	0,002652
		29,694			21,305						0,003789		
	2	28,014	27,925	0,126	20,695	20,666	0,041	7,259	0,094	0,007391	0,006938		
		27,836			20,637						0,007873		
A29 2º estádio	1	27,029	27,109	0,113	18,797	18,792	0,007	8,317	0,080	0,003613	0,003423	0,003014	0,000847
		27,189			18,787						0,003814		
	2	27,688	27,865	0,250	18,938	18,952	0,020	8,913	0,177	0,002415	0,002142		
		28,042			18,967						0,002723		
A29 3º estádio	1	28,969	28,712	0,364	20,010	19,970	0,056	8,742	0,260	0,002711	0,002273	0,002469	0,000342
		28,454			19,930						0,003233		
	2	29,193	29,018	0,247	20,076	19,985	0,128	9,033	0,197	0,002227	0,001950		
		28,843			19,895						0,002545		
A29 4º estádio	1	29,248	28,965	0,400	21,116	21,001	0,163	7,963	0,530	0,004590	0,003207	0,004742	0,000215
		28,682			20,886						0,006570		
	2	26,963	26,883	0,113	19,004	19,015	0,015	7,868	0,081	0,004894	0,004633		
		26,803			19,025						0,005169		

**Quadro J – Continuação...**

AMOSTRA	Corrida	Ct GmFAD3B	Média Ct GmFAD3B	SD GmFAD3B	Ct GAPDH	Média Ct GAPDH	SD GAPDH	$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	QR	SD QR/Corrida	QR Geral	SD Geral
FA22 1º estágio	1	25,841	25,811	0,042	19,551	19,679	0,182	6,132	0,132	0,015829	0,014479	0,013758	0,002928
		25,782			19,808								
	2	26,301	26,408	0,151	19,809	19,827	0,026	6,581	0,108	0,011688	0,010862	0,012577	
		26,515			19,845								
FA22 2º estágio	1	23,093	23,102	0,013	18,029	18,123	0,133	4,979	0,095	0,034526	0,032388	0,035326	0,001132
		23,111			18,218								
	2	22,554	22,550	0,005	17,578	17,639	0,086	4,912	0,061	0,036127	0,034663	0,037652	
		22,546			17,700								
FA22 3º estágio	1	25,563	25,332	0,328	20,005	19,769	0,333	5,562	0,330	0,023269	0,018610	0,023767	0,000704
		25,100			19,534								
	2	23,942	24,045	0,146	18,603	18,544	0,083	5,500	0,119	0,024265	0,022394	0,026292	
		24,148			18,485								
FA22 4º estágio	1	27,339	27,437	0,138	21,108	20,870	0,337	6,568	0,488	0,011791	0,008480	0,012365	0,000812
		27,535			20,631								
	2	25,870	26,375	0,715	19,963	19,945	0,025	6,430	0,506	0,012939	0,009192	0,018214	
		26,881			19,927								

Ct = Ciclo Threshold

SD = Desvio Padrão

$\Delta$  Ct = Ct do gene alvo – Ct do GAPDH

QR = Quantificação Relativa

**Quadro L** – Quantificação relativa dos transcritos do gene *GmFAD3C*

AMOSTRA	Corrida	Ct <i>GmFAD3C</i>	Média Ct <i>GmFAD3C</i>	SD <i>GmFAD3C</i>	Ct <i>GAPDH</i>	Média Ct <i>GAPDH</i>	SD <i>GAPDH</i>	$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	QR	SD QR/Corrida	QR Geral	SD Geral
N85-2176 1° estádio	1	28,687	28,751	0,090	21,827	21,515	0,441	7,236	0,318	0,008423	0,006827	0,005737	0,003798
		28,814			21,203						0,010391		
	2	30,226	30,224	0,004	21,431	21,450	0,026	8,774	0,019	0,003051	0,003014	0,003089	
		30,221			21,468								
N85-2176 2° estádio	1	26,882	26,801	0,114	20,481	20,441	0,057	6,360	0,090	0,015013	0,014144	0,011787	0,004562
		26,720			20,400						0,015935		
	2	26,805	26,751	0,076	19,483	19,540	0,081	7,211	0,078	0,008561	0,008130	0,009015	
		26,698			19,597								
N85-2176 3° estádio	1	27,524	27,328	0,276	20,857	20,978	0,170	6,351	0,229	0,015109	0,012987	0,010451	0,006588
		27,133			21,098						0,017579		
	2	27,376	27,231	0,205	19,361	19,428	0,094	7,803	0,159	0,005793	0,005214	0,006436	
		27,086			19,494								
N85-2176 4° estádio	1	28,646	28,881	0,333	21,580	22,382	1,135	6,499	0,857	0,013701	0,013701	0,010877	0,003994
		29,116			23,184						0,013701		
	2	27,226	27,471	0,346	20,155	20,167	0,017	7,304	0,245	0,008053	0,006851	0,009466	
		27,715			20,179								
Tucunaré 1° estádio	1	27,970	28,202	0,328	21,658	21,551	0,151	6,651	0,255	0,012392	0,010472	0,012307	0,000120
		28,434			21,445						0,014664		
	2	27,958	28,029	0,101	21,324	21,357	0,048	6,672	0,079	0,012222	0,011602	0,012874	
		28,100			21,391								
Tucunaré 2° estádio	1	30,269	30,136	0,188	23,382	23,281	0,143	6,856	0,167	0,010827	0,009697	0,010152	0,000954
		30,003			23,180						0,012089		
	2	27,606	27,722	0,164	20,697	20,665	0,045	7,057	0,120	0,009477	0,008756	0,010258	
		27,838			20,633								

**Quadro L – Continuação...**

AMOSTRA	Corrida	Ct GmFAD3C	Média Ct GmFAD3C	SD GmFAD3C	Ct GAPDH	Média Ct GAPDH	SD GAPDH	Δ Ct	SD Δ Ct	QR	SD QR/Corrida	QR Geral	SD Geral
Tucunaré 3° estádio	1	29,658	29,479	0,253	22,411	22,403	0,010	7,076	0,179	0,009359	0,008316	0,006381	0,004211
		29,301			22,396						0,010532		
	2	35,560	33,618	2,746	25,056	25,010	0,065	8,608	1,943	0,003404	0,000944	0,012273	
		31,676			24,964								
Tucunaré 4° estádio	1	27,667	27,919	0,357	21,120	20,925	0,276	6,993	0,562	0,009885	0,006820	0,008191	0,002396
		28,171			20,731						0,014329		
	2	29,666	30,173	0,717	22,586	22,544	0,059	7,629	0,509	0,006497	0,004644	0,009091	
		30,680			22,502								
A29 1° estádio	1	29,155	29,044	0,156	22,099	22,098	0,002	6,947	0,110	0,010195	0,009479	0,012245	0,002898
		28,934			22,096						0,010966		
	2	27,404	27,425	0,029	21,022	20,990	0,045	6,435	0,038	0,014294	0,013940	0,014657	
		27,446			20,959								
A29 2° estádio	1	25,725	25,672	0,075	19,512	19,555	0,061	6,117	0,068	0,017632	0,016857	0,014624	0,004253
		25,619			19,598						0,018442		
	2	26,327	26,287	0,057	19,466	19,538	0,102	6,749	0,083	0,011617	0,011001	0,012267	
		26,247			19,610								
A29 3° estádio	1	27,021	26,950	0,102	20,378	20,401	0,033	6,548	0,076	0,013261	0,012616	0,012299	0,001360
		26,878			20,425						0,013939		
	2	27,497	27,320	0,251	20,550	20,534	0,023	6,786	0,178	0,011338	0,010079	0,012754	
		27,142			20,518								
A29 4° estádio	1	27,921	27,891	0,042	21,483	21,361	0,172	6,529	0,327	0,013429	0,010820	0,012405	0,001448
		27,861			21,240						0,016667		
	2	26,441	26,214	0,321	19,475	19,434	0,058	6,780	0,231	0,011382	0,009772	0,013256	
		25,987			19,393								

**Quadro L – Continuação...**

AMOSTRA	Corrida	Ct GmFAD3C	Média Ct GmFAD3C	SD GmFAD3C	Ct GAPDH	Média Ct GAPDH	SD GAPDH	$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	QR	SD QR/Corrida	QR Geral	SD Geral
FA22 1° estádio	1	27,956	27,724	0,328	20,408	20,381	0,039	7,343	0,234	0,007847	0,006725	0,007214	0,000894
		27,492			20,354						0,009155		
	2	27,893	28,004	0,156	20,249	20,395	0,206	7,609	0,183	0,006582	0,005833	0,007428	
		28,115			20,541								
FA22 2° estádio	1	24,131	24,000	0,186	18,874	18,896	0,032	5,103	0,133	0,034423	0,031524	0,026687	0,010941
		23,869			18,919						0,037590		
	2	24,021	24,045	0,033	18,016	18,037	0,030	6,008	0,032	0,018950	0,018559	0,019350	
		24,068			18,058								
FA22 3° estádio	1	27,058	26,960	0,139	20,591	20,463	0,181	6,497	0,161	0,013719	0,012333	0,013717	0,000003
		26,862			20,335						0,015260		
	2	25,820	25,733	0,122	19,226	19,236	0,015	6,497	0,087	0,013714	0,012948	0,014526	
		25,647			19,246								
FA22 4° estádio	1	28,814	28,745	0,098	21,487	21,375	0,159	7,370	0,358	0,007707	0,006085	0,008211	0,000712
		28,676			21,263						0,009763		
	2	27,680	27,670	0,014	20,531	20,485	0,065	7,184	0,047	0,008714	0,008448	0,008988	
		27,660			20,439								

Ct = Ciclo Threshold

SD = Desvio Padrão

$\Delta$  Ct = Ct do gene alvo – Ct do GAPDH

QR = Quantificação Relativa