

ABELMON DA SILVA GESTEIRA

ESTUDO DE HERANÇA E DE MARCADORES MOLECULARES PARA TEOR DE ÁCIDO LINOLÊNICO EM SOJA

ESTUDO DE HERANÇA E DE MARCADORES MOLECULARES PARA TEOR DE ÁCIDO LINOLÊNICO EM SOJA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Genética e Melhoramento, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

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

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Genética e Melhoramento, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
OUTUBRO -1997

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

T

G393e
1997

Gesteira, Abelmon da Silva, 1967-
Estudo da herança e de marcadores moleculares para
teor de ácido linolênico em soja / Abelmon da Silva Ges-
teira. - Viçosa : UFV, 1997.
50p. : il.

Orientador: Maurílio Alves Moreira
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa

1. Soja - Herança de ácido linolênico. 2. Soja - Ácidos
graxos. 3. Soja - Marcador RAPD. I. Universidade Federal
de Viçosa. II. Título.

CDD. 19.ed. 633.343

CDD. 20.ed. 633.343

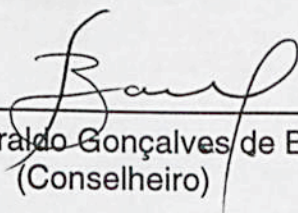
ABELMON DA SILVA GESTEIRA

ESTUDO DE HERANÇA E DE MARCADORES MOLECULARES PARA TEOR
DE ÁCIDO LINOLÊNICO EM SOJA

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Curso de Genética e
Melhoramento, para obtenção do título
de "Magister Scientiae".

A Deus,
Aos meus pais, pai (in memoriam) e Zenaida,
A Rita,
Aos meus familiares.

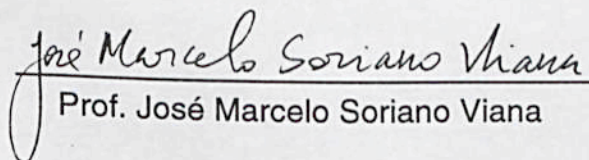
APROVADA: 28 de julho de 1997



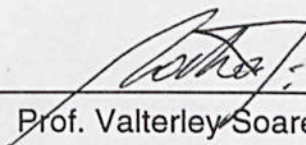
Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Conselheiro)



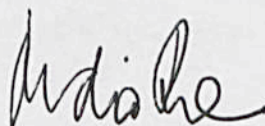
Pesq. Luiz Antônio dos Santos Dias



Prof. José Marcelo Soriano Viana



Prof. Valterley Soares Rocha



Prof. Maurilio Alves Moreira
(Orientador)

AGRADECIMENTO

- A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar o curso.
- A Deus,**
Aos meus pais Fábio (*in memoriam*) e Zenaide,
À Rita,
Aos meus familiares.
- Ao Professor Maurício Avelar Moreira, pela confiança e pela orientação.
- Ao Professor Evandro Gonçalves de Barros, pela orientação e pela amizade.
- Ao Professor César Siguelyuki Sedyama, pela orientação e pelas sugestões.
- À minha amiga e sócia Chizma José, pela amizade, pela agradável convivência e pela grande colaboração, que muito aprimorou este trabalho.
- Ao Ivan Schuster, pela amizade, pelas sugestões e pela colaboração nas análises genético-citológicas.
- Ao Newton Diniz Provesan, pela amizade e pela ajuda nos cruzamentos e na manutenção das plantas na casa de vegetação.
- Ao Professor José Marcelo Soriano Viana, pelas sugestões, que permitiram o aperfeiçoamento deste trabalho.
- Aos meus amigos de laboratório: Gláucia Fortes, Cláudia Guimarães, Cláudia Serret, Cássius, Darío, Geraldo, Henrique, Marcelo, Marco Antônio, Maria, Nathalia, Odilon, Silvana, Silas, Pôncio, Teófilo e Wagner, pelo companheirismo.

Aos meus amigos de república George, Gilberto, Márcio e Vitor Brasil, pela agradável convivência.

Enfim, a todos que participaram, de forma direta ou indireta, para que este trabalho pudesse ser realizado.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar o curso.

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

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

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela orientação e pela amizade.

Ao Professor Carlos Sigueyuki Sedyama, pela orientação e pelas sugestões.

À minha amiga Inês Chamel José, pela amizade, pela agradável convivência e pela grande colaboração, que muito aprimorou este trabalho.

Ao Ivan Schuster, pela amizade, pelas sugestões e pela colaboração nas análises genético-estatísticas.

Ao Newton Diniz Piovesan, pela amizade e pela ajuda nos cruzamentos e na manutenção das plantas na casa de vegetação.

Ao Professor José Marcelo Soriano Viana, pelas sugestões, que permitiram o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório Claudia Fortes, Claudia Guimarães, Claudai Serreti, Cristiano, Dario, Geraldo, Henrique, Marcelo, Marco Antônio, Marta, Nathalia, Odilon, Sebastião, Silvana, Silvia, Ronan, Telma e Vagner, pelo companheirismo.

Aos meus amigos de república George, Gilberto, Márcio e Victor Brasil, pela agradável convivência.

Enfim, a todos que participaram, de forma direta ou indireta, para que este trabalho pudesse ser realizado.

BIOGRAFIA

ABELMON DA SILVA GESTEIRA, filho de Fábio de Jesus Gesteira e Zenilda da Silva Gesteira, nasceu em Cruz das Almas, Estado da Bahia.

Curso o primeiro e o segundo grau em Cruz das Almas-BA.

Em setembro de 1974, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal da Bahia, em Cruz das Almas - BA.

Em março de 1995, iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa desta tese em 28 de julho de 1997.

BIOGRAFIA

ABELMON DA SILVA GESTEIRA, filho de Fábio de Jesus Gesteira e Zenaide da Silva Gesteira, nasceu em Cruz das Almas, Estado da Bahia.

Cursou o primeiro e o segundo grau em Cruz das Almas-BA.

Em setembro de 1994, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal da Bahia, em Cruz das Almas – BA.

Em março de 1995, iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa desta tese em 28 de julho de 1997.

2. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1. Material genético	10
2.2. Condução da população F ₂ e dos progênieos	10
2.3. Determinação de locais genéticos	11
2.4. Identificação de marcadores RAPD	12
2.4.1. Extração de DNA	12
2.4.2. Construção dos "bibliotecas"	12
2.4.3. Obtenção dos padrões de RAPD	13
2.5. Análises estatísticas	13
2.5.1. Cluster Analysis	13
2.5.2. Hierarchical	14
2.5.3. Correlation	14

EXTRATO

GESTEIRA, Abelmon da Silva, M.S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 1997. **Estudo de herança e de marcadores moleculares para teor de ácido linolênico em soja.** Professor Orientador: Maurilio Alves Moreira. Professores Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros e Carlos Sigueyuki Sedyama.

A redução do teor de ácido linolênico em soja está associado com a estabilidade oxidativa e melhoria do sabor do óleo. O acesso BARC-12, que possui baixo teor de ácido linolênico (3% em média), foi cruzado com o cultivar comercial CAC-1 (8,5 em média). Análises da composição dos ácidos graxos de sementes dos progenitores e da gerações F_1 , F_2 , e F_3 foram determinadas por cromatografia a gás, de forma não destrutiva. Os estudos de herança indicam que o teor de ácido linolênico é controlado por dois genes de efeito maior. Contudo, a distribuição contínua observada em sementes F_2 e em famílias F_3 sugere que genes de efeito menor também estão envolvidos. As gerações F_1 , F_2 , e F_3 também foram utilizadas para se estimarem alguns parâmetros genéticos. Análises quantitativas indicam que poucos genes com efeitos aditivos controlam o caráter em questão e que seus efeitos são principalmente aditivos. As estimativas de herdabilidade foram altas, possibilitando identificar, com precisão, os indivíduos desejados na população segregante, em gerações precoces. A metodologia "Bulked Segregant Analysis" foi utilizada para identificar marcadores

RAPD ligados a genes que determinam teor de ácido linolênico. Os 1000 "primers" aleatórios testados não detectaram nenhum polimorfismo de DNA que estivesse associado aos genes que controlam o baixo teor de ácido linolênico.

ABSTRACT

GESTEIRA, Abelson da Silva, M.S., Universidade Federal de Viçosa, October, 1997. Inheritance studies and molecular of linolenic acid content in soybean seeds. Advisor: Maurício Alves Moreira. Committee Members: Everado Gonçalves de Barros and Carlos Augusto Sediyama.

Genetic reduction of linolenic acid content in the soybean oil is considered to be important in order to increase oil stability and flavor. In this work, BARRC-12 (an accession from USDA, USA), that contain low level of linolenic acid (3% on average), was crossed to the Brazilian commercial variety CAC-1 (8.5% on average). Fatty acid composition of the oil fraction extracted from F_1 , F_2 , and F_3 seeds, by a non-destructive single seed analysis, was determined by gas chromatography. Inheritance studies indicated that linolenic acid levels are under the control of two independent major genes. However, the continuous distribution observed for linolenic acid content in F_2 seeds and in F_2 derived families suggested that minor genes also are involved. Quantitative analysis indicated that linolenic acid content in soybean is under the control of a low number of genes with additive effects. Estimated coefficient of heritability were high, indicating to be feasible to follow the character in individuals of segregant populations. Bulk segregant analysis was used to identify RAPD markers linked to gene(s) that determine low level of linolenic acid in F_2 population from the cross CAC-1 x

BARC-12. However, after testing 1000 primers, we were not able to find a RAPD marker linked to low linolenic acid in this cross.

ABSTRACT

GESTEIRA, Abelmon da Silva, M.S., Universidade Federal de Viçosa, October, 1997. **Inheritance studies and molecular of linolenic acid content in soybean seeds.** Adviser: Maurilio Alves Moreira. Committee Members: Everaldo Gonçalves de Barros and Carlos Siqueyuki Sedyama.

Genetic reduction of linolenic acid content in the soybean oil is considered to be important in order to increase oil stability and flavor. In this work, BARC-12 (an accession from USDA, USA), that contain low level of linolenic acid (3% on average), was crossed to the brazilian commercial variety CAC-1 (8.5% on average). Fatty acid composition of the oil fraction extracted from F₁, F₂, and F₃ seeds, by a non-destructive single seed analysis, was determined by gas chromatography. Inheritance studies indicated that linolenic acid levels are under the control of two independent major genes. However, the continuous distribution observed for linolenic acid content in F₂ seeds and in F₃ derived families suggested that minor genes also are involved. Quantitative analysis indicated that linolenic acid content in soybean is under the control of a low number of genes with additive effects. Stimated coefficient of heritabilities were high, indicating to be feasible to follow the character in individuals of segregant populations. Bulked segregant analysis was used to identify RAPD markers linked to gene(s) that determine low level of linolenic acid in F₂ population from the cross CAC-1 x

BARC 12. However, after testing 1000 primers, we were not able to find a RAPD marker linked to low linolenic acid in this cross.

INTRODUÇÃO

Óleos e gorduras, que quimicamente são triacilgliceróis, têm importante função na nutrição humana, por serem alimentos ricos em energia (TÖPFER et al., 1995). Noventa por cento do óleo vegetal produzido no mundo destina-se à alimentação humana, na forma de margarinas, gorduras vegetais hidrogenadas e óleos para saladas e frituras (SOMERVILLE e BROWSE, 1991; TÖPFER et al., 1995; YADAV, 1996). Os óleos vegetais apresentam grande variação nas fontes de ácidos graxos, indicando que nas espécies oleaginosas há extensa variação na composição dos ácidos graxos dos lipídios armazenados (TÖPFER et al., 1995).

A composição e a distribuição dos ácidos graxos em uma molécula de triacilglicerol determinam a qualidade do óleo, o valor nutricional, o sabor e propriedades físicas, como a estabilidade do óleo (SOMERVILLE e BROWSE, 1991; YADAV, 1996). A maioria dos ácidos graxos de plantas e de outros organismos tem cadeia longa de 16 a 18 carbonos e contém de uma a três ligações duplas em conformação *cis* (OHLROGGE e BROWSE, 1995). A via biossintética dos ácidos graxos é essencial para o crescimento de plantas e é considerada a principal via metabólica encontrada nas células vegetais (WANG e HILDEBRAND, 1988; SOMERVILLE e BROWSE, 1991), o que é confirmado pelo fato de inibidores da biossíntese de ácidos graxos serem letais para a célula vegetal (OHLROGGE e BROWSE, 1995).

INTRODUÇÃO

Óleos e gorduras, que quimicamente são triacilgliceróis, têm importante função na nutrição humana, por serem alimentos ricos em energia (TÖPFER et al., 1995). Noventa por cento do óleo vegetal produzido no mundo destina-se à alimentação humana, na forma de margarinas, gordura vegetal hidrogenada e óleos para saladas e frituras (SOMERVILLE e BROWSE, 1991; TÖPFER et al., 1995; YADAV, 1996). Os óleos vegetais apresentam grande variação nos teores de ácidos graxos, indicando que nas sementes oleaginosas há extensa variação na composição dos ácidos graxos dos lipídios armazenados (TÖPFER et al., 1995).

A composição e a distribuição dos ácidos graxos em uma molécula de triacilglicerol determinam a qualidade do óleo, o valor nutricional, o sabor e propriedades físicas, como a estabilidade do óleo (SOMERVILLE e BROWSE, 1991; YADAV, 1996). A maioria dos ácidos graxos de plantas e de outros organismos tem cadeia longa de 16 a 18 carbonos e contém de uma a três ligações duplas em conformação *cis* (OHLROGGE e BROWSE, 1995). A via biossintética dos ácidos graxos é essencial para o crescimento da planta e considerada a principal via metabólica encontrada nas células vegetais (WANG e HILDEBRAND, 1988; SOMERVILLE e BROWSE, 1991), o que é confirmado pelo fato de inibidores da biossíntese de ácidos graxos serem letais para a célula vegetal (OHLROGGE e BROWSE, 1995).

Todos os átomos de carbonos encontrados nos ácidos graxos são derivados do "pool" de acetil-CoA presente em cloroplastídios (OHLROGGE e BROWSE, 1995). A concentração de acetil-CoA no cloroplasto é de 30 a 50 μM , suficiente para suprir, somente por poucos segundos, a necessidade da síntese de ácidos graxos (POST-BEITTEMENILLER et al., 1992). Entretanto, o "pool" permanece constante mesmo quando a taxa de sínteses dos ácidos graxos é alta (ROUGHAN e SLACK, 1982).

O complexo enzimático acetil-CoA carboxilase (ACCase) catalisa a primeira reação da biossíntese de ácidos graxos, formando malonil-CoA a partir de acil-CoA e CO_2 . Essa reação ocorre em duas etapas. Na primeira, em que a reação é dependente de ATP, o CO_2 (de HCO_3^-) é transferido pela porção biotina carboxilase da ACCase para o nitrogênio do grupo prostético biotina ligado ao grupo ϵ -amino do resíduo de lisina. Na segunda, em que a reação é catalisada pela carboxitransferase, o CO_2 ativado é transferido da biotina para acetil-CoA para formar malonil-CoA (OHLROGGE e BROWSE, 1995).

As plantas são fundamentalmente diferentes de outros organismos eucarióticos na organização molecular das enzimas da síntese dos ácidos graxos. Para produzir ácidos graxos com 16 ou 18 carbonos a partir de acetil-CoA e malonil-CoA, são requeridas no mínimo 30 reações enzimáticas (SOMERVILLE e BROWSE, 1991). O principal composto doador de carbono para síntese de ácidos graxos é o malonil-CoA produzido pela ACCase. Antes de entrar na via de síntese dos ácidos graxos, o grupo malonil é transferido da CoA para a proteína co-fator, proteína carreadora de acil (ACP). A partir desse ponto, todas as reações da via envolvem ACP, até que a produção de 16 ou 18 carbonos esteja pronta para ser exportada para o plastídio. Após a transferência para o ACP, o tioéster-malonil entra na série de reações de condensação com aceptores acil-ACP (ou acetil-CoA). Essas reações resultam na formação de ligações C-C e na liberação do CO_2 que foi adicionado pela ACCase (OHLROGGE e BROWSE, 1995).

No mínimo, três enzimas de condensação, também conhecidas como β -cetoacil-ACP sintetase, são requeridas para produzir ácidos graxos com cadeia de 18 carbonos. A primeira condensação de acetil-CoA e malonil-CoA para produzir quatro carbonos é catalisada pela β -cetoacil-ACP sintetase III (JAWORSKI et al., 1989). Acredita-se que a enzima de condensação β -cetoacil-ACP sintetase I

seja responsável pela produção da cadeia longa de 6 para 16 carbonos. Finalmente, a elongação de 16 carbonos palmitoil-ACP para esteroil-ACP requer a enzima β -cetoacil-ACP sintase II. O produto inicial de cada reação de condensação é o β -cetoacil-ACP. Três reações adicionais ocorrem após cada condensação para formar um ácido graxo saturado. O β -cetoacil-ACP é reduzido ao grupo carbonil pela enzima β -cetoacil redutase, que usa NADPH como doador de elétron. A próxima reação é a desidrogenação pela hidroxilacil-ACP desidrase. Cada ciclo da síntese dos ácidos graxos é, então, completado pela enzima enoil-ACP redutase, que usa NADH ou NADPH para reduzir a dupla ligação, formando ácidos graxos saturados (SOMERVILLE e BROWSE, 1991).

A via da biossíntese dos ácidos graxos produz ácidos graxos saturados. Mas, em muitos tecidos vegetais, acima de 75% dos ácidos graxos são insaturados. Nas plantas existem duas vias para biossínteses de ácidos graxos poliinsaturados, uma localizada no retículo endoplasmático e a outra em plastídios (Heinz, 1993, citado por YADAV, 1996). As vias de biossíntese dos ácidos linoléico e linolênico são dependentes de O_2 , e as dessaturações são catalisadas pela dessaturase do oleato e pela dessaturase do linoleato, respectivamente. A fosfatidilcolina é o substrato do glicerolípido primário para biossínteses de ácidos graxos poliinsaturados no retículo endoplasmático. Galactolipídios são os substratos primários na membrana do plastídio. No retículo endoplasmático de *Arabidopsis*, as dessaturações do oleato e linoleato são controladas pelos *locus Fad 2* e *Fad 3*, respectivamente, ao passo que no plastídio as dessaturações do oleato e linoleato são controladas pelos *locus Fad 6* e *Fad 7*, respectivamente. Tanto a via do retículo endoplasmático como a via do plastídio operam no tecido foliar com troca significativa entre seus intermediários, no entanto a via do retículo endoplasmático predomina durante a biossíntese do óleo no desenvolvimento de sementes e em outros tecidos não verdes. Entretanto, a contribuição relativa da via do plastídio pode ser significativa num óleo com baixo teor de ácidos graxos poliinsaturados (YADAV, 1996).

Segundo Schwe et al. (1986), citados por HILDEBRAND (1989), os quatro principais sistemas enzimáticos que operam em plantas superiores, modificando seus ácidos graxos, são: α -oxidação, β -oxidação, ω -oxidação e a via lipoxigenase. Esta via, em particular, tem maior importância para a qualidade do alimento. A

enzima lipoxigenase (LOX), que catalisa a hidroperoxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, é encontrada em muitos tecidos de plantas e animais (HILDEBRAND,1992). Múltiplas formas ou isoenzimas de lipoxigenase estão presentes nesses tecidos. As sementes de soja contêm, no mínimo, três isoenzimas LOX, que são codificadas por genes distintos. Estes foram clonados e seqüenciados (HILDEBRAND,1989). Várias isoenzimas LOX, tais como LOX 1, de sementes de soja têm pouca reatividade para ácidos graxos esterificados (HILDEBRAND,1992).

A hidroperoxidação dos ácidos graxos resultante da ação de LOX é metabolizada por uma das duas vias que operam nos tecidos de plantas. Na primeira via, hidroperoxido liase catalisa a quebra de 13-hidroperoxido dos ácidos linoléico e linolênico, formando ácido 12-oxi-*cis*-dodecanóico e hexanal ou *cis*-3-hexanal. Na segunda via, hidroperoxido desidrase converte ácido linolênico em óxido aleno, que, por reações subseqüentes, é convertido em ácido jasmônico (HILDEBRAND, 1989).

O controle genético da síntese dos ácidos graxos poliinsaturados tem sido muito estudado, por meio da obtenção e caracterização de mutantes que apresentam diferentes composições desses ácidos. Mutantes de várias espécies de plantas têm sido obtidos por tratamento com agentes mutagênicos (químicos e físicos). Os efeitos da mutação são expressos com máxima intensidade quando as plantas crescem em temperaturas acima de 26 °C, porém são relativamente menos intensos, abaixo de 18 °C, indicando que as enzimas envolvidas na biossíntese de ácidos graxos são sensíveis à temperatura (WANG e HILDEBRAND, 1988).

A maioria dos 210 tipos de ácidos graxos conhecidos sintetizados por plantas não tem nenhum valor econômico, porque são produtos de plantas não cultivadas. Mas o melhoramento tradicional e a engenharia genética podem fornecer meios para transferir essa vasta capacidade de produção de óleos específicos para plantas cultivadas de alto valor econômico. Para ambos os usos, nutricional e não-nutricional, os métodos de melhoramento tradicional e transgênico têm sido usados para mudar o grau de saturação e reduzir ou aumentar a cadeia de ácidos graxos (KINNEY, 1994).

Variações genéticas da composição dos ácidos graxos têm sido utilizadas para manipular a composição destes em sementes oleaginosas. Por exemplo, o

óleo de semente de linho contém alta porcentagem de ácido linolênico (45 a 65%). Esses altos níveis prejudicam o seu uso como óleo comestível, restringindo-o à indústria não alimentícia. Genótipos com 2% de ácido linolênico foram obtidos (GREEN, 1986) pela seleção de sementes F₂ do cruzamento entre dois mutantes com baixos teores de ácido linolênico. Essa redução do teor de ácido linolênico nessas sementes oleaginosas foi acompanhada pelo aumento dos teores do ácido oléico (WANG e HILDEBRAND, 1988). Esses resultados indicam que as mutações afetam a dessaturação do oléico para o linolênico. Análises genéticas do cruzamento entre esses mutantes revelaram que os teores de ácido linolênico são controlados por dois genes, os quais apresentam efeitos gênicos aditivos (GREEN, 1986).

O óleo de semente de soja é muito comum no mundo (SMITH, 1981) e, entre os óleos vegetais, o que apresenta menor custo de produção, visto que é um co-produto do farelo de soja (alimento rico em proteínas) (YADAV, 1996). A composição média do óleo de soja é cerca de 15% de ácidos graxos saturados (palmítico e esteárico), 25% de monoinsaturado (oléico) e 60% de ácidos poliinsaturados (linoléico e linolênico) (ECONOMIC, 1990). O alto teor de ácidos graxos poliinsaturados tem sido considerado fator importante na redução da estabilidade à oxidação e do sabor do óleo. Cultivares comerciais de soja (*Glycine max*) possuem teores de ácido linolênico entre 6 e 15% do óleo da semente. Em outras espécies do gênero *Glycine*, o teor de ácido linolênico varia de 11,3 a 27,2% (SMITH, 1981). A inexistência de genótipos com baixo teor de ácido linolênico no óleo da semente de soja levou a outras alternativas para reduzir o teor de ácido linolênico.

O uso de agentes químicos mutagênicos, no melhoramento de soja, tem sido considerado um método eficaz para produzir mutantes com baixo teor de ácido linolênico. Tratamento com EMS (metanossulfonato de etila) alterou significativamente a composição de ácidos graxos no cultivar de soja "Century". Um mutante geneticamente estável denominado C1640, com 3,4% de ácido linolênico, foi identificado (WILCOX et al., 1984). Essa mutação é controlada por um gene simples (WILCOX e CAVINS, 1985), denominado *Fan* (WILCOX e CAVINS, 1987). Tratamento com EMS, seguido de seleção recorrente, resultou em uma linhagem melhorada, denominada A5, com teor de ácido linolênico de 2,9 a 4,1% (HAMMOND e FEHR, 1983). GRAEF et al. (1988) demonstraram que a

composição de ácidos graxos pode ser considerada um caráter quantitativo em cruzamentos que envolvem A5 como progenitor. O decréscimo no teor de ácido linolênico em A5 é, aparentemente, resultante do decréscimo da taxa de dessaturação do ácido oléico.

A principal meta no melhoramento da qualidade do óleo de soja tem sido o aumento da sua estabilidade oxidativa, pela redução do teor de ácido linolênico e pelo aumento do teor de ácido oléico. O ácido linolênico sofre oxidação, resultando na rancificação e queda de sabor (Frankel, 1980, citado por YADAV, 1996). O ácido oléico não é estável como os ácidos graxos saturados, entretanto é cerca de 10 vezes mais estável que o ácido linoléico e pelo menos 20 vezes mais estável que o ácido linolênico (ECONOMIC, 1990).

O óleo de soja comercial é hidrogenado, o que reduz quimicamente as duplas ligações, resultando em maior estabilidade e melhor sabor. Contudo, a necessidade de hidrogenação reduz o atrativo econômico de se usar a fração óleo de soja. Além do mais, mesmo o óleo de soja hidrogenado possui odores que são atribuídos à presença do isolinoleato, produto da hidrogenação. Portanto, a estabilidade natural do óleo de soja poderia resultar em baixo custo de processamento e melhoria do sabor (YADAV, 1996).

Este trabalho teve como objetivos determinar o controle genético para baixo teor de ácido linolênico no acesso BARC 12 e utilizar marcadores RAPD para mapear genes ligados a essa característica no cruzamento entre BARC-12 e CAC-1, além de avaliar a natureza e a magnitude dos efeitos gênicos que controlam esse caráter em soja.

CAPITULO 1

ESTUDO DE HERANÇA E DE MARCADORES MOLECULARES PARA TEOR DE ÁCIDO LINOLÊNICO EM SOJA

1. INTRODUÇÃO

A composição de ácidos graxos de óleos e gorduras determina suas propriedades para potenciais aplicações na indústria de alimentos. A fração óleo extraída de sementes da maioria das espécies oleaginosas não apresenta uma composição de ácidos graxos que atenda a todos os requerimentos da indústria alimentícia. Em consequência, há crescente interesse em se introduzirem modificações genéticas que promovam alterações na composição do óleo de sementes oleaginosas (Rottray, 1991, citado por OSÓRIO et al., 1995). O óleo de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é um dos principais óleos vegetais comestíveis. Contém altos níveis de ácido linolênico (de 8 a 12%, em média), que é facilmente oxidado a compostos químicos de baixo peso molecular que determinam o aparecimento de sabores e odores desagradáveis (HO et al., 1978; MOUNTS et al., 1978). O óleo de soja refinado é usualmente hidrogenado, com o objetivo de reduzir o teor de ácido linolênico a níveis aceitáveis (BURTON et al., 1983). EVANS et al. (1965) afirmaram que a redução genética dos níveis de ácido

linolênico para valores menores do que 5% certamente aumentará a qualidade e a estabilidade do óleo de soja.

Recentes desenvolvimentos em biotecnologia de plantas têm fornecido alternativas para se alterar a composição de ácidos graxos de óleos vegetais. A biossíntese dos principais ácidos graxos encontrados nesses óleos é, razoavelmente, bem conhecida (HILDEBRAND, 1992). Os ácidos oléico, linoléico e linolênico são os principais ácidos graxos insaturados presentes no óleo de soja. Tem sido demonstrado que ocorre correlação negativa entre os teores dos ácidos oléico e linoléico e, também, entre os dos ácidos oléico e linolênico (RAHMAN et al., 1994). Esses ácidos graxos insaturados são sintetizados por consecutivas dessaturações do ácido esteárico, produzindo os ácidos oléico, linoléico e linolênico. Tais reações de dessaturação envolvem enzimas conhecidas como dessaturases, que catalisam a remoção do hidrogênio (HILDEBRAND, 1992).

A indução da variabilidade genética por agentes mutagênicos poderia possibilitar a identificação e o isolamento de mutantes de interesse em espécies oleaginosas exploradas comercialmente, apresentando em suas sementes a fração óleo com a composição de ácidos graxos alterada (GRAEF et al., 1988; BUBECK et al., 1989; SCHNEBLY et al., 1994). A idéia do uso de plantas transgênicas, transformadas por genes que codificam enzimas específicas do metabolismo de lipídios, os quais alteram a composição final de ácidos graxos dos lipídios de reserva em espécies oleaginosas, é promissora (OSÓRIO et al., 1995). Apesar disso, nenhum cultivar transgênico com tais características foi produzido até a presente data.

Durante a seleção de linhagens de soja com baixo teor de ácido linolênico, alguns pesquisadores têm selecionado, indiretamente, linhagens com altos teores de ácido oléico, fator que também apresenta importância na qualidade do óleo de soja (RAHMAN et al., 1994). Observações preliminares feitas por BURTON et al. (1983) indicaram que a seleção para obtenção de altos teores de ácido oléico pode reduzir os teores de ácido linoléico em maiores proporções, em comparação com os teores de ácido linolênico.

De acordo com HU et al. (1995), a concentração de ácido linolênico da fração óleo de *Brassica napus* é influenciada por fatores ambientais, o que faz com que a resposta da seleção baseada no fenótipo seja baixa. Progressos na

tentativa de reduzir o teor do ácido linolênico da fração óleo dessa oleaginosa têm sido lentos. A identificação e o uso de marcadores baseados no DNA ligados a genes mutantes certamente aumentarão a eficiência da seleção para essa característica.

O objetivo do presente trabalho foi determinar o controle genético do teor de ácido linolênico, bem como identificar marcadores RAPD ligados a genes que condicionam essa característica no cruzamento entre BARC-12 (acesso com baixo teor de ácido linolênico, cerca de 3%) e o cultivar comercial CAC-1 (com teores normais de ácido linolênico, cerca de 8 a 12%).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

O genótipo BARC-12 com média de 30 g.kg⁻¹ de ácido linolênico foi desenvolvido pela USDA-ARS em Beltsville, MD (LEFFEL, 1994). Esse acesso foi cruzado com o cultivar comercial CAC-1, com média de 85 g.kg⁻¹ de ácido linolênico.

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação, em 1995. As sementes recombinadas híbridas, com base nos teores de ácidos graxos, foram semeadas em vasos com dois litros de substrato, cultivando-se duas plantas por vaso. As plantas F₁ foram colhidas individualmente, e a planta F₁ que produziu maior número de sementes, deu origem à geração F₂.

A planta F₁ produziu 357 sementes F₂, as quais foram colhidas em dezembro de 1995 e numeradas individualmente, para posterior determinação do teor de ácidos graxos.

2.2. Condução da população F₂ e dos testes genéticos

As sementes F₂ e dos progenitores foram semeadas diretamente em vasos com capacidade para dois litros e substrato, colocando-se três sementes

por vaso. As plantas foram colhidas individualmente, e a planta F_1 , que produziu maior número de sementes, deu origem à geração F_2 .

As plantas F_2 foram colhidas individualmente, e numeradas individualmente, para posterior determinação do teor de ácidos graxos. As plantas F_2 foram colhidas em dezembro de 1995 e numeradas individualmente, para posterior determinação do teor de ácidos graxos.

As plantas F_2 foram colhidas individualmente, e numeradas individualmente, para posterior determinação do teor de ácidos graxos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

O genótipo BARC-12 com menos de 30 g.kg^{-1} de ácido linolênico foi desenvolvido pelo USDA-ARS em Beltsville, MD (LEFFEL, 1994). Esse acesso foi cruzado com o cultivar comercial CAC-1, com média de 85 g.kg^{-1} de ácido linolênico.

Os cruzamentos foram realizados em casa de vegetação, em 1995. As sementes confirmadas híbridas, com base nos teores de ácidos graxos, foram semeadas em vasos com dois litros de substrato, cultivando-se duas plantas por vaso. As plantas F_1 foram colhidas individualmente, e a planta F_1 , que produziu maior número de sementes, deu origem à geração F_2 .

A planta F_1 produziu 357 sementes F_2 , as quais foram colhidas em dezembro de 1995 e numeradas individualmente, para posterior determinação do teor de ácidos graxos.

2.2. Condução da população F_2 e dos progenitores

As sementes F_2 e dos progenitores foram semeadas diretamente em vasos com capacidade para dois litros de substrato, colocando-se três sementes

por vaso. As plantas se desenvolveram sob fotoperíodo natural em casa de vegetação, com aquecimento e ventilação.

As plantas foram etiquetadas individualmente, e coletaram-se três a quatro folíolos novos, completamente expandidos de cada planta F_2 , os quais foram embalados em papel-alumínio, devidamente identificados, mergulhados em nitrogênio líquido e levados ao laboratório, onde foram armazenados em "freezer", à temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, até a época de extração do DNA.

Para confirmar o estudo de herança, realizado na população F_2 , os teores de ácido linolênico foram analisados em 10 sementes de cada uma das 45 famílias F_3 , escolhidas de forma aleatória. Para confirmar o genótipo de plantas F_2 , consideradas homozigotas, usadas para construir os "bulks" (ver item 2.4.2.) nos experimentos com marcadores RAPD, foram analisadas cinco famílias F_3 derivadas de plantas F_2 com alto teor de ácido linolênico e cinco famílias F_3 derivadas de plantas F_2 com baixo teor desse ácido.

2.3. Determinação de ácidos graxos

A identificação e a quantificação de ácidos graxos presentes em soja (palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico) foram realizadas por cromatografia gasosa. No preparo das amostras, foi utilizado um método não destrutivo, de forma a preservar o poder de germinação das sementes. Uma porção de 30 mg foi cortada de cada semente e triturada manualmente, utilizando-se uma lâmina. A cada amostra de 15 mg do material triturado foi adicionado 1 ml de hexano, sendo a mistura mantida a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por cerca de 16 horas, sob atmosfera de N_2 . Após esse tempo, a solução de lipídios em hexano foi transferida para outro tubo e o solvente, evaporado por borbulhamento de N_2 . Para a obtenção dos ésteres metílicos, utilizou-se a metodologia descrita por BUBECK et al. (1989). À fração lipídica foi adicionado 0,4 ml de metóxido de sódio 1 M, sendo os tubos mantidos em banho-maria, a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, por cerca de uma hora. Acrescentaram-se, então, 1 ml de água e 1 ml de hexano. Após uma hora, com o auxílio de uma pipeta, cerca de 0,75 ml da fase orgânica foi transferida para outros tubos, aos quais se adicionou sulfato de sódio anidro. Finalmente, 1 μl da fase orgânica foi injetado em cromatógrafo a gás GC-17A, equipado com

auto-injetor AOC-17 e integrador C-R7A, marca SHIMADZU. Utilizou-se coluna Carbowax (30 m × 0,32 mm) e as condições de análise empregadas foram: temperatura da coluna igual a 225 °C; do injetor, 245 °C; e do detector, 280 °C. O gás de arraste foi o nitrogênio, com um fluxo de 1,3 ml/min.

2.4. Identificação de marcadores RAPD

2.4.1. Extração de DNA

Após a identificação das plantas com baixo e alto teores de ácido linolênico feita pela análise de cromatografia gasosa, amostras de DNA das folhas foram extraídas e purificadas, seguindo a metodologia descrita por DOYLE e DOYLE (1990). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro, considerando-se que uma OD₂₆₀ é equivalente a, aproximadamente, 50 ng/μl de DNA fita dupla. A qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em minigéis de agarose 0,8%, corados com brometo de etídio.

2.4.2. Construção dos “bulks”

A identificação de marcadores RAPD ligados a um ou mais genes que controlam o teor de ácido linolênico foi feita, utilizando-se o método de “Bulked Segregant Analysis” (BSA), descrito por MICHELMORE et al. (1991). Nesse método, a seleção de indivíduos para construir os “bulks” é feita, utilizando-se os fenótipos extremos de uma população F₂ segregante para a característica de interesse. Dentro de cada “bulk”, os indivíduos são similares para o caráter ou região genômica, mas arbitrários para as outras características que estiverem segregando. Os “bulks” foram testados para identificar marcadores que apresentavam bandas presentes em uma amostra e ausentes em outra, ou seja, marcadores que as diferenciem. Alíquotas de DNA de plantas com baixo e alto teor de ácido linolênico, numa concentração de 10 ng/ul, foram agrupadas separadamente, para formar dois “bulks”, sendo cada “bulk” constituído por DNA

de cinco plantas. Os polimorfismos encontrados entre os dois "bulks, se confirmados nos indivíduos componentes de cada "bulk", observando-se a sua co-segregação na população segregante usada na construção dos "bulks", têm grande chance de estarem ligados aos genes que controlam a expressão do caráter de interesse.

2.4.3. Obtenção dos padrões de RAPD

Os "bulks" de DNA foram analisados com 1.000 "primers" decâmeros. Cada reação de amplificação de 25 µl continha 25 ng de DNA, 0,1 mM de cada um dos deoxinucleotídios (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 2,0 mM de MgCl₂; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM de KCl; 0,4 µM de um oligonucleotídio iniciador ou "primer" (Operon Technologies, Alameda, CA, EUA); e uma unidade de Taq DNA polimerase.

As reações de amplificação foram efetuadas em termociclador Perkin-Elmer, modelo 9600, de acordo com WILLIAMS et al. (1990). Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma etapa de desnaturação a 94 °C, por 15 segundos; uma etapa de ligação do "primer" ao DNA molde a 35 °C, por 30 segundos; e uma etapa de extensão a 72 °C, por um minuto. Depois de 40 ciclos, efetuou-se uma última etapa de extensão a 72 °C, por sete minutos. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,2% contendo 10 mg/ml de brometo de etídio, imerso em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com o sistema de fotodocumentação "Eagle Eye II" (STRATAGENE).

2.5. Análise estatística

2.5.1. Classes fenotípicas

As sementes F₂ e as famílias F₃ foram divididas nas seguintes classes, com base nos teores de ácido linolênico dos progenitores: **A** - teor de ácido linolênico igual ao do progenitor com baixo teor ($\bar{x}_1 \pm 2\sigma$), **B** - teor de ácido

linolênico igual ao do progenitor com alto teor ($\bar{x}_2 \pm 2\sigma$) e **C** - teor de ácido linolênico intermediário entre as classes A e B, sendo \bar{x}_1 e \bar{x}_2 as médias dos progenitores com baixo e alto teor de ácido linolênico, respectivamente. A variação de 2σ nas médias dos progenitores foi utilizada, pois nesse intervalo se encontra aproximadamente 95% dos possíveis valores que o estimador pode assumir, admitindo-se que o mesmo tem distribuição normal. A segregação observada foi avaliada pelo teste qui-quadrado (χ^2).

2.5.2. Herdabilidades

Foi possível estimar a herdabilidade no sentido amplo, em nível de indivíduo na população F_2 e em nível de médias de famílias F_3 , para os cinco ácidos graxos, segundo a expressão de MAHMUD e KRAMER (1951) mostrada abaixo:

$$h^2a = \frac{\left\{ \sigma^2_{f(us)} - (\sigma^2_{f(p_1)} \cdot \sigma^2_{f(p_2)})^{1/2} \right\}}{\sigma^2_{f(us)}}$$

em que

h^2a = estimador de herdabilidade no sentido amplo;

$\sigma^2_{f(us)}$ = estimador de variância fenotípica em unidade de seleção; e

$\sigma^2_{f(p_1)}$ e $\sigma^2_{f(p_2)}$ = estimadores das variâncias fenotípicas dos progenitores.

2.5.3. Correlações

As correlações fenotípicas dos cinco ácidos graxos foram estimadas da seguinte forma (FALCONER, 1987):

$$r_{f_{X_1X_2}} = \frac{C\hat{O}V_f(X_1, X_2)}{\sqrt{\hat{\sigma}^2_{f_{X_1}} \hat{\sigma}^2_{f_{X_2}}}}$$

em que

$r_{f_{X_1 X_2}}$ = estimador do coeficiente de correlação fenotípica entre os caracteres X_1 e X_2 ;

X_2 ;

$\widehat{COV}(X_1, X_2)$ = estimador da covariância fenotípica entre os caracteres X_1 e X_2 ; e

$\widehat{\sigma}^2_{f_{X_1}}$ e $\widehat{\sigma}^2_{f_{X_2}}$ = estimadores das variâncias fenotípicas dos caracteres X_1 e X_2 ,

respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Herança

A composição média dos ácidos graxos dos progenitores e da geração F_1 encontra-se no Quadro 1. Os progenitores não estão contrastando quanto aos teores dos ácidos palmítico e esteárico. Constata-se, por meio desse quadro, que o cruzamento BARC-12 estava segregando para os ácidos oleico e linoléico e não para o linoléico, conforme observado no desvio-padrão.

Quadro 1 - Média dos teores e desvio-padrão dos ácidos graxos em sementes de BARC-12, CAC-1 e F_1

População	Ácidos Graxos				
	Palmítico	Esteárico	Oleico	Linoléico	Linolênico
BARC-12	10,58 ± 0,72	5,80 ± 0,42	32,45 ± 2,06	50,25 ± 5,45	3,41 ± 0,17
CAC-1	12,45 ± 0,70	4,71 ± 0,34	19,20 ± 1,45	69,00 ± 1,05	8,65 ± 5,44
F_1	11,74 ± 0,34	5,82 ± 0,42	27,54 ± 1,25	52,79 ± 1,20	5,04 ± 0,81

As médias dos progenitores, em sementes F_2 e em famílias F_3 , e o qui-quadrado para os teores de ácido linoléico estão apresentados no Quadro 2.

A segregação observada em sementes F_2 e em famílias F_3 do cruzamento entre BARC-12 e CAC-1 ajustou-se à razão 1:14:1 (Quadro 2, Figuras 1 e 2). Conclui-se que pelo menos dois genes maiores, com distribuição independente, são responsáveis pelo teor de ácido linolênico, pois 1/16 das sementes em F_2 foi geneticamente semelhante a cada progenitor do cruzamento (Quadro 1). Os resultados de FEHR et al. (1992) também indicaram que, nos cruzamentos entre as linhagens A75 e A77 (parentes com baixo teor de ácido linolênico) com o cultivar Cantary 54 (parente em relação ao teor de ácido linolênico), dois genes estavam envolvidos na segregação genética do teor de ácido linolênico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora que o teor de ácido linolênico em BARC-12, a distribuição contínua (Figura 1), observada em F_2 do cruzamento entre BARC-12 e CAC-1, indica que genes com efeitos menores também foram importantes na expressão do ácido linolênico.

3.1. Herança

A composição média dos ácidos graxos dos progenitores e da geração F_1 encontra-se no Quadro 1. Os progenitores não estão contrastando quanto aos teores dos ácidos palmítico e esteárico. Constata-se, por meio desse quadro, que o acesso BARC-12 estava segregando para os ácidos oléico e linoléico e não para o linolênico, conforme observado no desvio-padrão.

Quadro 1 - Média dos teores e desvio-padrão dos cinco ácidos graxos em sementes de BARC-12, CAC-1 e F_1

População	Ácidos Graxos				
	Palmítico	Esteárico	Oléico	Linoléico	Linolênico
BARC-12	10,58 ± 0,78	3,50 ± 0,42	32,48 ± 8,00	50,26 ± 6,45	3,41 ± 0,17
CAC-1	10,43 ± 0,38	3,71 ± 0,34	19,20 ± 1,45	58,00 ± 1,06	8,66 ± 0,44
F_1	11,74 ± 0,34	3,82 ± 0,42	22,54 ± 1,85	53,39 ± 1,60	5,04 ± 0,61

As médias dos progenitores, em sementes F_2 e em famílias F_3 , e o qui-quadrado para os teores de ácido linolênico estão apresentados no Quadro 2.

Quadro 1. A segregação observada em sementes F_2 e em famílias F_3 do cruzamento entre BARC-12 e CAC-1 ajustou-se à razão 1:14:1 (Quadro 2, Figuras 1 e 2). Conclui-se que pelo menos dois genes maiores, com distribuição independente, são responsáveis pelo teor de ácido linolênico, pois 1/16 das sementes em F_2 foi geneticamente semelhante a cada progenitor do cruzamento (Quadro 1). Os resultados de FEHR et al. (1992) também indicaram que, nos cruzamentos entre as linhagens A16 e A17 (mutantes com baixo teor de ácido linolênico) com o cultivar Century 84 (normal em relação ao teor de ácido linolênico), dois genes estavam envolvidos no controle genético do teor de ácido linolênico.

Embora genes com efeitos maiores estejam envolvidos no controle do teor de ácido linolênico em BARC-12, a distribuição contínua (Figura 1), observada em F_2 do cruzamento entre BARC-12 e CAC-1, indica que genes com efeitos menores também foram importantes na expressão do ácido linolênico. Esses resultados foram semelhantes aos apresentados por WILCOX e CAVINS (1987), GRAEF et al. (1988), RENNIE e TANNER (1991) e FEHR et al. (1992), que também apontaram que genes de efeitos maiores e menores estavam envolvidos na herança do teor de ácido linolênico. Um indicativo da importância de genes de efeitos menores foi a segregação observada no cruzamento A5 \times Century 84, na qual a segregação em F_2 e de famílias F_3 não apresentou a mesma razão mendeliana (FEHR et al., 1992).

Esses resultados indicam que se pode fazer, com grande possibilidade de sucesso, seleção em gerações precoces, em um programa de melhoramento genético que visa produzir cultivares com baixo teor de ácido linolênico, considerando que o teor desse ácido no cruzamento entre BARC-12 e CAC-1 é controlado por poucos genes, com efeito maior e com base nas estimativas de herdabilidade obtidas (Quadro 3).

Quadro 1 - Teores de ácido linolênico em sementes de soja dos progenitores, F₂, e F₃

População	$\bar{x} \pm \sigma$	Variação	Nº Observado*			χ^2	P
		%	A	B	C	1:14:1	
BARC-12	3,35 ± 0,18	3,07 - 3,58					
CAC-1	8,48 ± 0,36	7,97 - 9,16					
F ₂	5,75 ± 1,31		23	310	24	0,16	> 0,90
BARC-12	4,14 ± 0,42	3,78 - 4,91					
CAC-1	10,23 ± 1,04	8,63 - 11,87					
F ₃	6,85 ± 1,65		3	38	4	0,56	> 0,80

A = número de sementes F₂ e famílias F₃ com valores semelhantes ao do progenitor com baixo teor de ácido linolênico
 B = número de sementes F₂ e famílias F₃ com valores semelhantes ao do progenitor com baixo teor de ácido linolênico
 C = classe intermediária.



Figura 1 - Distribuição da frequência de sementes F₂ comparando os progenitores BARC-12 e CAC-1, em relação ao teor de ácido linolênico.

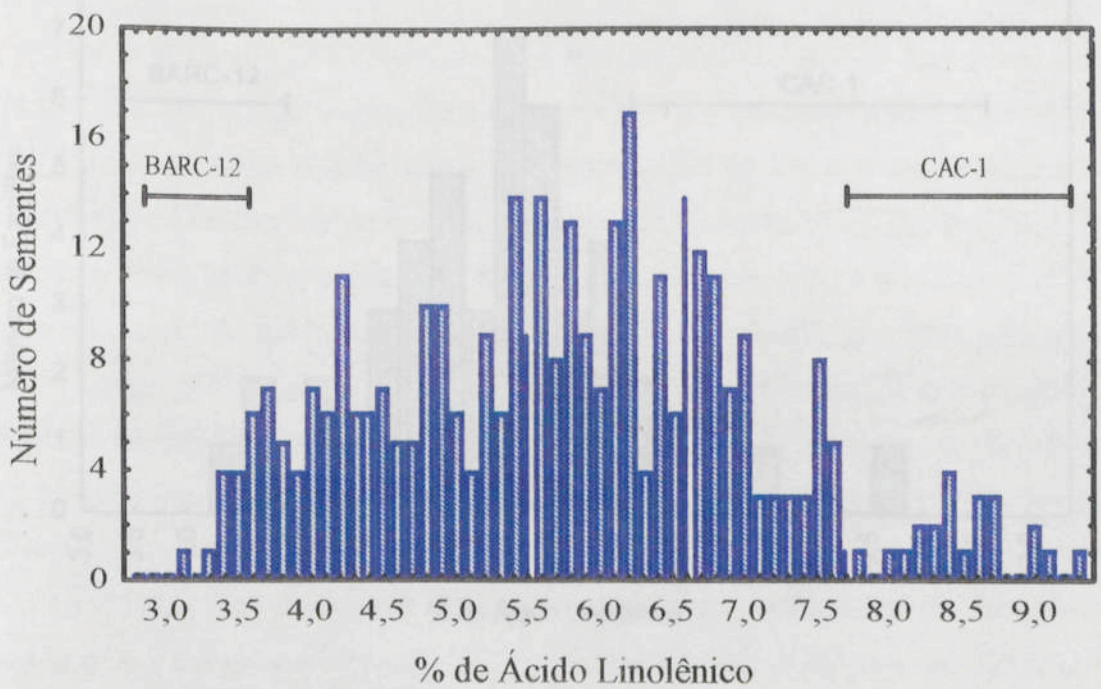


Figura 1 - Distribuição de frequência de sementes F_2 , derivadas do cruzamento entre BARC-12 e CAC-1, em relação ao teor de ácido linolênico.

2. Herdabilidade

As estimativas de herdabilidade no sentido amplo, para os cinco ácidos graxos, referentes às sementes F_2 e às famílias F_3 , são apresentadas no Quadro 1. Para todos os ácidos graxos, as estimativas de herdabilidade foram altas, indicando que fatores genéticos têm contribuição mais pronunciada que aquelas devidas a fatores de ambiente, na expressão fenotípica do caráter (ALCONER, 1987). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por FEHR *et al.* (1992) e RAHMAN e TAKAGI (1997).

Os caracteres influenciados por poucos genes, geralmente, apresentam alta herdabilidade em gerações precoces, ocorrendo fixação de tipos distintos em poucas gerações de autocruzamento (ANAND E TORRIE, 1963). As estimativas de herdabilidade obtidas indicam que é possível fazer seleção em gerações precoces, facilitando a condução de um programa de melhoramento que visa à modificação da composição de óleo das sementes.

5. Conclusões

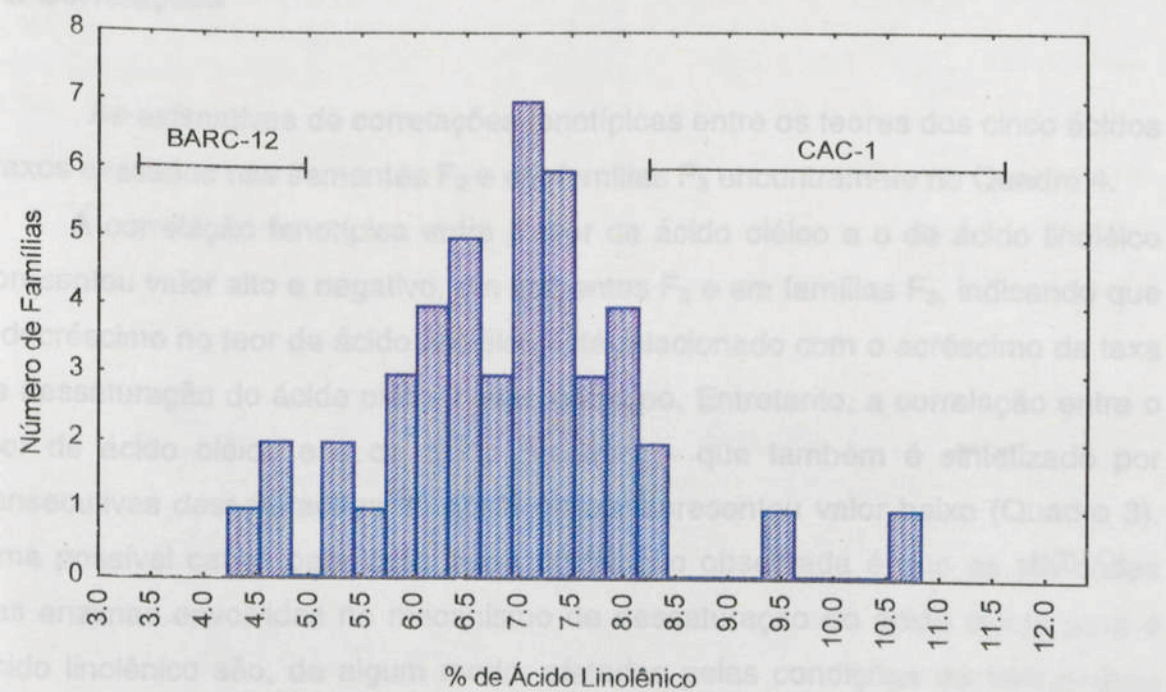


Figura 3 - Distribuição de frequência das famílias F_3 , derivadas do cruzamento entre BARC-12 e CAC-1, em relação ao teor de ácido linolênico.

3.2. Herdabilidade

As estimativas de herdabilidade no sentido amplo, para os cinco ácidos graxos, referentes às sementes F_2 e às famílias F_3 , são apresentadas no Quadro 3. Para todos os ácidos graxos, as estimativas de herdabilidade foram altas, indicando que fatores genéticos têm contribuição mais pronunciada que aquelas atribuídas a fatores de ambiente, na expressão fenotípica do caráter (FALCONER, 1987). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por FEHR et al. (1992) e RAHMAN e TAKAGI (1997).

Os caracteres influenciados por poucos genes, geralmente, apresentam alta herdabilidade em gerações precoces, ocorrendo fixação de tipos distintos em poucas gerações de autofecundação (ANAND E TORRIE, 1963). As estimativas de herdabilidade obtidas indicam que é possível fazer seleção em gerações precoces, facilitando a condução de um programa de melhoramento que visa à modificação da composição do óleo das sementes.

3.3. Correlações

As estimativas de correlações fenotípicas entre os teores dos cinco ácidos graxos avaliados nas sementes F_2 e em famílias F_3 encontram-se no Quadro 4.

A correlação fenotípica entre o teor de ácido oléico e o de ácido linoléico apresentou valor alto e negativo, em sementes F_2 e em famílias F_3 , indicando que o decréscimo no teor de ácido linoléico está relacionado com o acréscimo da taxa de dessaturação do ácido oléico nesse genótipo. Entretanto, a correlação entre o teor de ácido oléico e o de ácido linolênico, que também é sintetizado por consecutivas dessaturações do ácido oléico, apresentou valor baixo (Quadro 3). Uma possível causa para essa baixa correlação observada é que as atividades das enzimas envolvidas no mecanismo de dessaturação do ácido oléico para o ácido linolênico são, de algum modo, afetadas pelas condições de temperatura prevalentes durante a síntese de lipídios de reserva (WANG e HILDEBRAND, 1988).

Quadro 3 - Estimativas de herdabilidades no sentido amplo, para cinco caracteres, em nível de semente F₂ e de média de família F₃

Caráter	Sementes F ₂	Famílias F ₃
Ácido Palmítico	0,94	0,86
Ácido Esteárico	0,88	0,88
Ácido Oléico	0,98	0,98
Ácido Linoléico	0,98	0,97
Ácido Linolênico	0,96	0,88

Quadro 4 - Estimativas de correlações fenotípicas entre os cinco caracteres avaliados em sementes F₂ e famílias F₃

Caracteres	Sementes F ₂	Famílias F ₃
Ácido Palmítico e Esteárico	0,24	0,41
Ácido Palmítico e Oléico	-0,20	-0,50
Ácido Palmítico e Linoléico	0,02	0,10
Ácido Palmítico e Linolênico	0,10	0,17
Ácido Esteárico e Oléico	-0,25	-0,59
Ácido Esteárico e Linoléico	0,15	-0,26
Ácido Esteárico e Linolênico	0,06	0,23
Ácido Oléico e Linoléico	-0,94	-0,56
Ácido Oléico e Linolênico	-0,28	-0,37
Ácido Linoléico e Linolênico	0,03	0,05

3.4. Marcadores moleculares

Amostras de DNA extraídas de plantas da população F_2 , do cruzamento BARC-12 x CAC-1, foram analisadas pelo método BSA ("Bulked Segregant Analysis"), proposto por MICHELMORE et al. (1991), na busca de marcadores RAPD ligados a gene(s) que condiciona(m) baixo teor de ácido linolênico. Para isso, selecionaram-se cinco plantas de cada extremo fenotípico da distribuição com base no teor de ácido linolênico.

Os "bulks" de DNA das plantas com baixo e alto teor de ácido linolênico da população F_2 foram amplificados com cada "primer", dos 1.000 "primers" oligonucleotídios, constituídos das séries OPA a OPZ e OPAA a OPAX completas. No entanto, nenhum polimorfismo encontrado entre os "bulks" mostrou estar ligado a gene(s) responsável(eis) pelo baixo teor de ácido linolênico.

A maioria das bandas mostrou-se monomórfica, não diferenciando os dois "bulks". As Figuras 3 e 4 ilustram produtos polimórficos OPR-04, OPR-16 e OPR-14, que tinham grande chance de estarem ligados a genes com baixo teor de ácido linolênico. Para confirmar se esses produtos polimórficos estavam ligados aos genes de interesse, foram analisados, em cada indivíduo separadamente, constituintes dos dois "bulks", observando-se a co-segregação entre o marcador e o fenótipo. Entretanto, não houve confirmação de qualquer ligação dessas bandas polimórficas com os genes de interesse, pela presença dessas bandas tanto em indivíduos com alto quanto com baixo teor de ácido linolênico.

A não-identificação de marcadores RAPD ligados a gene(s) que condiciona(m) baixos teores de ácido linolênico indica que as regiões que flanqueiam o(s) gene(s) de interesse não foram amplificadas. De acordo com GOLDBERG (1978), o genoma da soja possui $1,81 \times 10^9$ pares de base. Como a técnica de RAPD gera, em média, cinco produtos de amplificação com 1.000 pares de base em média (WILLIAMS et al., 1993) por "primer", a utilização de 1.000 "primers" possibilitou amplificar, no máximo, $5,0 \times 10^6$ pares de base, ou seja, 0,27% do genoma. Esse fato pode justificar a não-identificação de marcadores RAPD ligados ao(s) gene(s) de interesse, uma vez que os "primers" usados não são específicos para determinada região do genoma.

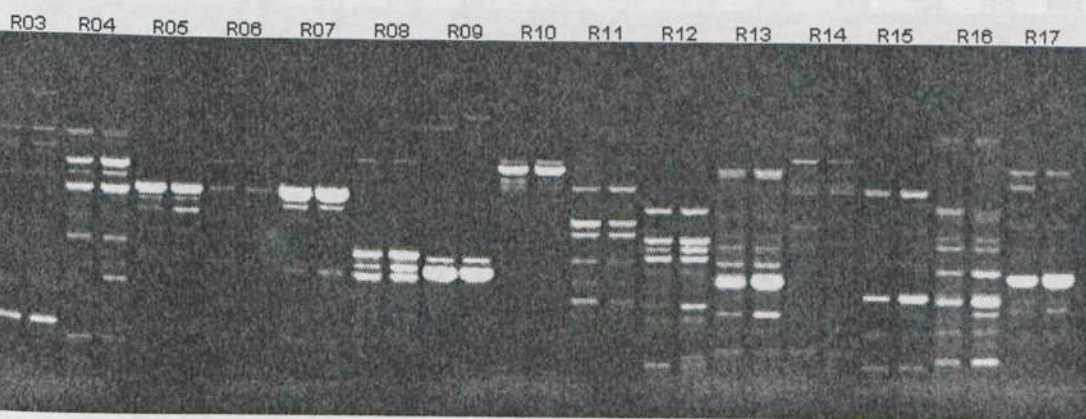


Figura 3 - Padrões de bandas amplificadas com os "primers" OPR-03 a OPR-17, utilizando-se DNA genômico de plantas F_2 de soja. A primeira canaleta de cada par do mesmo "primer" representa o "bulk" das plantas com alto teor de ácido linolênico e, a segunda, o das com baixo teor.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

A redução do teor de ácido linolênico em soja está relacionada com a estabilidade oxidativa e a melhoria do sabor do óleo. Este é um dos temas do programa de melhoramento do Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), que visa ao desenvolvimento de cultivares de soja com variedades de melhor qualidade e valor para a alimentação humana.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de determinar e validar marcadores moleculares RAPD ligados a genes

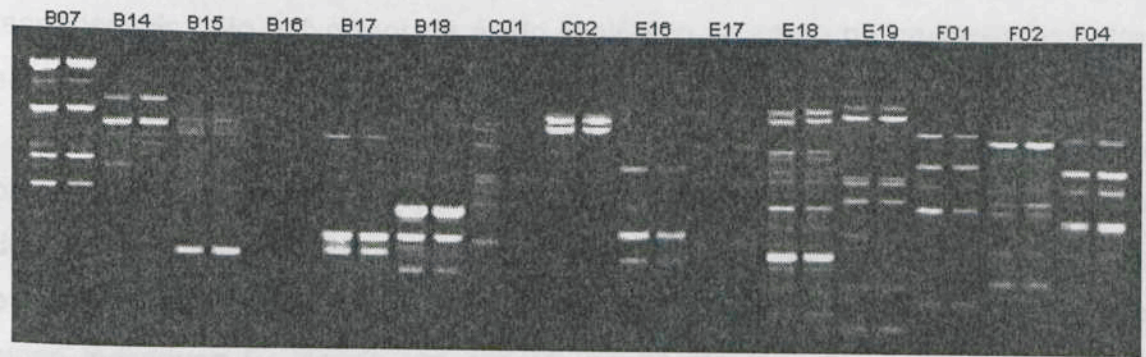


Figura 4 - Padrões de bandas amplificadas com os "primers" OPB-07, OPB-14 a OPB-18, OPC-01, OPC-02, OPE-16 a OPE-19, OPF-01, OPF-02 e OPF-04, utilizando-se DNA genômico de plantas F₂ de soja. A primeira canaléa de cada par do mesmo "primer" representa o "bulk" das plantas com alto teor de ácido linolênico e, a segunda, o das com baixo teor.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

A redução do teor de ácido linolênico em soja está relacionada com a estabilidade oxidativa e a melhoria do sabor do óleo. Essa é uma das metas do programa de melhoramento do Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), que visa ao desenvolvimento de cultivares de soja com sementes de melhor qualidade e sabor para a alimentação humana.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de determinar o modo de herança, bem como encontrar marcadores moleculares RAPD ligados a genes responsáveis pelo baixo teor de ácido linolênico presente no cruzamento entre o acesso BARC-12 e o cultivar comercial CAC-1.

Com o intuito de atingir os objetivos do presente trabalho, foram avaliados os progenitores BARC-12 e CAC-1 e as populações F_1 , F_2 e F_3 . Cada semente dos progenitores e as sementes de F_1 , F_2 e F_3 foram numeradas individualmente e os teores de ácidos graxos, determinados. Foram formados dois "bulks" com cinco indivíduos F_2 , sendo um constituído de plantas com baixo teor de ácido linolênico e outro de plantas com alto teor desse ácido. Esses "bulks" foram analisados pela técnica de RAPD, utilizando-se a metodologia do BSA.

A segregação das sementes F_2 ajustou-se à razão 1:14:1, indicando que dois genes maiores, com distribuição independente, controlam o caráter. Entretanto, a distribuição contínua observada no cruzamento indica que genes menores estão também envolvidos na expressão do caráter.

A herdabilidade estimada para os teores de ácido linolênico nas sementes F_2 e em famílias F_3 foi alta, o que justificaria a seleção em gerações precoces num programa de melhoramento, pois é possível identificar indivíduos desejáveis nas populações segregantes.

Não foi possível identificar nenhum marcador RAPD associado aos genes que determinam baixo teor de ácido linolênico, o que pode ser atribuído à não amplificação nas regiões flangeadoras dos genes de interesse.

CAPÍTULO 2

ESTUDOS BIOMÉTRICOS DO TEOR DE ÁCIDO LINOLÊNICO EM SOJA

1. INTRODUÇÃO

O óleo de soja é um dos principais produtos vegetais, em comparação com outros óleos comestíveis. Entretanto, existem algumas características desse óleo com relação à nutrição e funcionalidade, que devem ser consideradas quando comparadas com as de outros óleos vegetais, em particular com aqueles que foram geneticamente modificados (YADAV, 1996).

A função e o valor nutricional do óleo vegetal podem ser influenciados pelo controle da composição dos ácidos graxos. O ácido linolênico possui várias duplas ligações, o que o torna altamente suscetível à oxidação. O trabalho de NEFF et al. (1992), existe correlação positiva ($r = 0,81$) entre a taxa de formação de peróxidos e o número de duplas ligações presentes nos ácidos graxos. Também, ocorre correlação negativa ($r = -0,29$) entre o teor de ácido linolênico e o sabor do óleo (LIU e WHITE, 1992). Portanto, tem-se utilizado a hidrogenação do óleo de soja para reduzir a taxa desse ácido graxo em até 25%, reduzindo a susceptibilidade do óleo à oxidação. Entretanto, a hidrogenação é um processo dependente e a hidrogenação catalítica dos ácidos linolênico e linoléico não é totalmente controlada (YADAV, 1996). Dessa forma, o estudo de herança e de estimativas da parâmetros genéticos associados ao teor de ácido linolênico é de

CAPITULO 2

ESTUDOS BIOMÉTRICOS DO TEOR DE ÁCIDO LINOLÊNICO EM SOJA

1. INTRODUÇÃO

O óleo de soja tem baixo custo de processamento, em comparação com outros óleos comestíveis. Entretanto, existem algumas características desse óleo, com relação a nutrição e funcionalidade, que devem ser melhoradas quando comparadas com as de outros óleos vegetais, em particular com aqueles que foram geneticamente modificados (YADAV, 1996).

A função e o valor nutricional do óleo vegetal podem ser direcionados pelo controle da composição dos ácidos graxos. O ácido linolênico possui três duplas ligações, o que o torna altamente sensível à oxidação. De acordo com NEFF et al. (1992), existe correlação positiva ($r = 0,81$) entre a taxa de formação de peróxidos e o número de duplas ligações presentes nos ácidos graxos. Também, ocorre correlação negativa ($r = -0,89$) entre o teor de ácido linolênico e o sabor do óleo (LIU e WHITE, 1992). Portanto, tem-se utilizado a hidrogenação do óleo de soja para reduzir o teor desse ácido para menos de 2%, reduzindo a sensibilidade do óleo à oxidação. Entretanto, a hidrogenação é um processo dispendioso, e a hidrogenação seletiva dos ácidos linoléico e linolênico não é totalmente controlada (YADAV, 1996). Diante disso, o estudo de herança e de estimativas de parâmetros genéticos associados ao teor de ácido linolênico é de

suma importância em programas de melhoramento de soja que visam alterar a composição de ácidos graxos constituintes da fração óleo.

Dentre os parâmetros genéticos que podem ser estimados, pode-se destacar a herdabilidade, sendo ressaltado que a herdabilidade de um caráter quantitativo é uma das mais importantes de suas propriedades. Ela expressa a proporção da variância total que é atribuída ao efeito médio dos genes que determinam o grau de semelhança entre as plantas. Outra importante função da herdabilidade é o seu papel preditivo, expressando a confiança do valor fenotípico como guia para o valor genético ou o grau de correspondência entre valor fenotípico e valor genotípico (FALCONER, 1987). Por esse motivo, as herdabilidades fazem parte da maioria das expressões empregadas no melhoramento genético (JOHNSON e BERNARD, 1967). A herdabilidade é uma propriedade não somente de um caráter, mas também da população e das circunstâncias às quais as plantas estão sujeitas (FALCONER, 1987).

O objetivo deste trabalho foi estudar a herança do teor de ácido linolênico, bem como avaliar a natureza e a magnitude dos efeitos gênicos que controlam esse caráter em soja, a partir do cruzamento entre o acesso BARC-12 e o cultivar comercial CAC-1

vaso. As plantas se desenvolveram sob temperatura natural em casa de vegetação, com aquecimento e ventilação.

2.3. Determinação de ácidos graxos

A identificação e a quantificação de ácidos graxos presentes em semente (palmitico, esteárico, ôleico, linoléico e linolênico) foram realizadas por cromatografia gasosa. No processo das amostras, foi utilizado um método não destrutivo, de forma a preservar a integridade da composição das sementes. Uma porção de 30 mg foi

2. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizando-se uma lâmina. A cada amostra de 10 mg de material triturado foi adicionado 1 ml de hexano, sendo a temperatura mantida a 4 °C por cerca de 16 horas, sob atmosfera de N₂. Após esse tempo, a solução de lipídios em hexano foi

2.1. Material genético

Para a obtenção das sementes híbridas, utilizou-se a metodologia descrita por BUEB. O genótipo BARC-12, com menos de 30 g.kg⁻¹ de ácido linolênico, foi desenvolvido pelo USDA-ARS em Beltsville, MD (LEFFEL, 1994). Esse acesso foi cruzado com o cultivar comercial CAC-1, com média de 85 g.kg⁻¹ de ácido linolênico.

Os cruzamentos foram realizados em casa de vegetação, em 1995. As sementes confirmadas híbridas, com base nos teores de ácidos graxos, foram semeadas em vasos com dois litros de substrato, cultivando-se duas plantas por vaso. As plantas F₁ foram colhidas individualmente, e a planta F₁, que produziu maior número de sementes, deu origem à geração F₂.

A planta F₁ produziu 357 sementes F₂, as quais foram colhidas em dezembro de 1995 e numeradas individualmente, para a análise não destrutiva da sua composição de ácidos graxos.

2.2. Condução da população F₂ e dos progenitores

As sementes F₂ e dos progenitores foram semeadas diretamente em vasos com capacidade para dois litros de substrato, colocando-se três sementes por

vaso. As plantas se desenvolveram sob fotoperíodo natural em casa de vegetação, com aquecimento e ventilação.

2.3. Determinação de ácidos graxos

A identificação e a quantificação de ácidos graxos presentes em soja (palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico) foram realizadas por cromatografia gasosa. No preparo das amostras, foi utilizado um método não destrutivo, de forma a preservar o poder de germinação das sementes. Uma porção de 30 mg foi cortada de cada semente e triturada manualmente, utilizando-se uma lâmina. A cada amostra de 15 mg do material triturado foi adicionado 1 ml de hexano, sendo a mistura mantida a 4 °C por cerca de 16 horas, sob atmosfera de N₂. Após esse tempo, a solução de lipídios em hexano foi transferida para outro tubo e o solvente, evaporado por borbulhamento de N₂. Para a obtenção dos ésteres metílicos, utilizou-se a metodologia descrita por BUBECK et al. (1989). À fração lipídica foi adicionado 0,4 ml de metóxido de sódio 1 M, sendo os tubos mantidos em banho-maria, a 30 °C, por cerca de uma hora. Acrescentaram-se, então, 1 ml de água e 1 ml de hexano. Após uma hora, com o auxílio de uma pipeta, cerca de 0,75 ml da fase orgânica foi transferida para outros tubos, aos quais se adicionou sulfato de sódio anidro. Finalmente, 1 µl da fase orgânica foi injetado em cromatógrafo a gás GC-17A, equipado com auto-injetor AOC-17 e integrador C-R7A, marca SHIMADZU. Utilizou-se coluna Carbowax (30 m × 0,32 mm) e as condições de análise empregadas foram: temperatura da coluna igual a 225 °C; do injetor, 245 °C; e do detector, 280 °C. O gás de arraste foi o nitrogênio, com um fluxo de 1,3 ml/min.

2.4. Estudos genéticos de variâncias e médias

2.4.1. Estudos genéticos de variâncias

2.4.1.1. Variâncias fenotípicas, genotípicas e de ambiente

Utilizando-se os progenitores BARC-12 (P2) e CAC-1(P1) e as gerações F₁, F₂ e F₃, foram estimados os componentes da variância fenotípica, variância genotípica e variância devido ao ambiente. A variância genotípica pode ser explicada como uma função das variâncias genéticas aditivas e devido à dominância na população base F₂. Assim, segundo CRUZ e REGAZZI (1994), demonstrou-se que

$$\sigma^2 f_{(F_2)} = \sigma^2 g_{(F_2)} + \sigma^2 e$$

$$\sigma^2 f_{(F_3)} = \sigma^2 g_{(F_3)} + \sigma^2 e$$

$$\sigma^2 e = \frac{1}{4} [\sigma^2 f_{(P1)} + 2\sigma^2 f_{(F_1)} + \sigma^2 f_{(P2)}]$$

$$\sigma^2 g_{(F_2)} = \frac{1}{2} \sum a^2 + \frac{1}{4} \sum d^2 = \sigma^2 A + \sigma^2 D$$

$$\sigma^2 g_{(F_3)} = \frac{3}{4} \sum a^2 + \frac{3}{16} \sum d^2 = \frac{3}{2} \sigma^2 A + \frac{3}{4} \sigma^2 D$$

Considerando-se que a variância ambiental é a mesma, tanto em F₂ como em F₃, tem-se

$$\sigma^2 A = \frac{1}{2} \sum a^2 = \frac{4}{3} \sigma^2 f_{(F_3)} - \sigma^2 f_{(F_2)} - \frac{1}{3} \sigma^2 e$$

$$\sigma^2 D = \sigma^2 g_{(F_2)} - \sigma^2 A$$

em que $\sigma^2 g = \sigma^2 f_{(F_2)} - \sigma^2 e$

σ^2_f : variância fenotípica;

σ^2_g : variância genotípica;

σ^2_e : variância ambiental;

σ^2_A : variância aditiva;

σ^2_D : variância devida aos desvios de dominância;

d : valor genotípico codificado do heterozigoto; e

a : valor genotípico codificado do homozigoto de maior expressão.

2.4.1.2. Grau médio de dominância

O grau médio de dominância (d/a) foi estimado pela seguinte expressão

(CRUZ e REGAZZI, 1994):

$$k = \sqrt{\frac{2\hat{\sigma}^2_D}{\hat{\sigma}^2_A}}$$

O valor do estimador k será igual a 1 quando houver dominância completa, isto é, d = a, e igual a zero quando houver ausência de dominância (d = 0). Quando houver sobredominância, o estimador k será maior do que 1 (d > a); quando houver dominância parcial, o estimador será maior que zero e menor que 1 (d < a).

A simetria da distribuição de freqüências da geração F₂ também fornece subsídios para avaliação do grau médio de dominância. Segundo ALLARD (1971), quando for reduzido o número de genes que controlam um caráter e estes manifestarem dominância unidirecional, as distribuições serão assimétricas. Quando houver ausência de dominância, a distribuição será simétrica. A simetria da distribuição na geração F₂, que é uma relação entre o terceiro e o segundo momento da distribuição em torno da média, foi calculada pela seguinte expressão (ZAR, 1996):

A amplitude total entre as médias dos pais é preferida quando eles são muito divergentes, pois esta estimativa é menos influenciada pelo ambiente, em comparação com a amplitude em F_2 .

2.4.1.4. Herdabilidade

As herdabilidades em sentidos amplo e restrito foram calculadas, utilizando-se as seguintes expressões, respectivamente:

$$h^2_a = \frac{\hat{\sigma}^2_g}{\hat{\sigma}^2_f}$$

$$h^2_r = \frac{\hat{\sigma}^2_A}{\hat{\sigma}^2_f}$$

sendo os parâmetros σ^2_{gus} , σ^2_{fus} e σ^2_{Aus} , respectivamente, as variâncias genóticas, fenotípicas e aditiva entre as unidades de seleção.

2.4.2. Estudos genéticos de médias

2.4.2.1. Estimação de parâmetros genéticos a partir do modelo completo

Os componentes genéticos das médias foram estimados a partir do ajuste do modelo $Y = X\beta + \varepsilon$, em que:

$$Y = \begin{bmatrix} \bar{P}_1 \\ \bar{P}_2 \\ \bar{F}_1 \\ \bar{F}_2 \\ \bar{F}_3 \end{bmatrix} \quad X = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 1/2 & 0 & 1/4 \\ 1 & 0 & 1/4 & 0 & 1/16 \end{bmatrix} \quad \beta = \begin{bmatrix} m \\ a \\ d \\ aa \\ dd \end{bmatrix} \quad \varepsilon = \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ e_3 \\ e_4 \\ e_5 \end{bmatrix}$$

$$\hat{aa} = \frac{1}{2}\bar{P}1 + \frac{1}{2}\bar{P}2 - \frac{1}{3}\bar{F}_1 + 2\bar{F}_2 - \frac{8}{3}\bar{F}_3$$

$$\hat{dd} = \frac{8}{3}\bar{F}_1 - 8\bar{F}_2 + \frac{16}{3}\bar{F}_3$$

$\hat{V}(P2) = \sigma^2_{1+2}/n_2$ (n_2 = número de indivíduos na população P2);

A significância da hipótese de que cada parâmetro seja nulo foi avaliada pelo teste t, descrito por CRUZ e REGAZZI (1994), como

$\hat{V}(F_1) = \sigma^2_{(1-1)} + \sigma^2_{(1-2)}/n_1$ (n_1 = número de indivíduos da geração F₁);

$\hat{V}(F_2) = (\sigma^2_{(2-1)} + \sigma^2_{(2-2)})/n_2$ (n_2 = número de indivíduos da geração F₂);

$$t = \frac{\hat{\beta}_i}{\sqrt{\hat{V}(\hat{\beta}_i)}}$$

Na expressão anterior, $\sigma^2_{(1-1)}$ e $\sigma^2_{(1-2)}$ são as variâncias multiplicadas entre

O número de graus de liberdade utilizado no teste foi dado pela soma dos graus de liberdade de cada família que constituía a expressão do estimador. Assim, por exemplo, para se testar $H_0: a = 0$, utilizou-se $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade.

A variância de cada efeito foi obtida com aplicação das propriedades de variância em cada expressão do estimador do respectivo parâmetro genético, admitindo-se que as médias das famílias são independentes (CRUZ e REGAZZI, 1994). As expressões para cálculo das variâncias são as seguintes:

$$\hat{V}(\hat{m}) = \frac{1}{9}\hat{V}(\bar{F}_1) + 4\hat{V}(\bar{F}_2) + \frac{64}{9}\hat{V}(\bar{F}_3)$$

$$\hat{V}(\hat{a}) = \frac{1}{4}\hat{V}(\bar{P}1) + \frac{1}{4}\hat{V}(\bar{P}2)$$

$$\hat{V}(\hat{d}) = 4\hat{V}(\bar{F}_1) + 100\hat{V}(\bar{F}_2) + 64\hat{V}(\bar{F}_3)$$

$$\hat{V}(\hat{aa}) = \frac{1}{4}\hat{V}(\bar{P}1) + \frac{1}{4}\hat{V}(\bar{P}2) + \frac{1}{9}\hat{V}(\bar{F}_1) + 4\hat{V}(\bar{F}_2) + \frac{64}{9}\hat{V}(\bar{F}_3)$$

$$\hat{V}(\hat{dd}) = \frac{64}{9}\hat{V}(\bar{F}_1) + 64\hat{V}(\bar{F}_2) + \frac{256}{9}\hat{V}(\bar{F}_3)$$

A decomposição de soma de quadrados de polinômios associados ao

modelo solido-dominante, em termos de quadrados e linhas a cada efeito

em que

$$\hat{V}(\bar{P}_1) = \hat{\sigma}_{f(P_1)}^2 / n_1 \quad (n_1 = \text{número de indivíduos na população P1});$$

$$\hat{V}(\bar{P}_2) = \hat{\sigma}_{f(P_2)}^2 / n_2 \quad (n_2 = \text{número de indivíduos na população P2});$$

$$\hat{V}(\bar{F}_1) = \hat{\sigma}_{f(F_1)}^2 / n_3 \quad (n_3 = \text{número de indivíduos da geração F}_1);$$

$$\hat{V}(\bar{F}_2) = \hat{\sigma}_{f(F_2)}^2 / n_4 \quad (n_4 = \text{número de indivíduos da geração F}_2); \text{ e}$$

$$\hat{V}(\bar{F}_3) = (\hat{\sigma}_{fe(F_3)}^2 + \hat{\sigma}_{fd(F_3)}^2) / n_5 \quad (n_5 = \text{número de indivíduos da geração F}_3).$$

Na expressão anterior, $\hat{\sigma}_{fe(F_3)}^2$ e $\hat{\sigma}_{fd(F_3)}^2$ são as variâncias fenotípicas entre e dentro de famílias F_3 , respectivamente.

2.4.2.2. Teste do modelo aditivo-dominante

Para o teste de adequação do modelo aditivo-dominante, foi utilizado o método de mínimos quadrados ponderados, uma vez que as médias das cinco gerações estudadas podem não ter sido obtidas com igual precisão (MATHER e JINKS, 1984). Nesse caso, admitiu-se que o vetor de erros associados às médias tinha média nula e matriz de variâncias e covariâncias D , sendo D uma matriz diagonal. O estimador $\hat{\beta}$ é dado por

$$\hat{\beta} = (X'D^{-1}X)^{-1}X'D^{-1}Y$$

O vetor de parâmetros foi estimado da mesma maneira descrita anteriormente, sendo excluídas da matriz X as colunas referentes aos efeitos epistáticos. A adequação do modelo aditivo-dominante foi avaliada por meio da quantificação do coeficiente de determinação (R^2), que expressa o grau de similaridade entre os valores estimados e observados.

A decomposição da soma de quadrados de parâmetros associada ao modelo aditivo-dominante, em somas de quadrados atribuídas a cada efeito

individual, ajustadas para os demais efeitos, foi feita pela triangulação da matriz aumentada $[X'D^{-1}X | X'D^{-1}Y]$, pelo Método de Eliminação de Gauss, conforme descrito por CRUZ e REGAZZI (1994).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Herança e herdabilidade

Os valores e variâncias do teor de ácido fólico avaliados nas cinco populações estudadas encontram-se no Quadro 1. No Quadro 2, apresentam-se as estimativas de variâncias e herdabilidades nas gerações F_2 e F_3 .

A amplitude da distribuição dos teores de ácido fólico das sementes F_2 e o número de genes que determinam o caráter são apresentados no Quadro 3.

Os resultados apresentados no Quadro 2 conduzem a uma estimativa negativa de h^2 . Considerou-se então a variância dentro dos clones de sementes como sendo a variância fenotípica, podendo ser desprezada. Em razão disso, concluiu-se que a herdabilidade da semente real é igual à herdabilidade no indivíduo, e a variância fenotípica da geração F_2 é a seguinte:

$$\sigma_p^2 = \sigma_e^2 + \sigma_{cl}^2$$

Com base nesse resultado, pode-se concluir que 75,02% da variância observada na população F_2 é atribuída à causa genética da natureza aditiva. Essa alta estimativa de variância real é um bom indicativo de possibilidade de melhoramento genético por seleção de indivíduos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quadro 1. Médias e variâncias do teor de ácido linolênico nas cinco gerações estudadas.

Geração	Média (%)	Variância (σ^2)	Her. (h ²)
P ₁	22,0	0,000	0,000
P ₂	22,0	0,000	0,000
F ₂	22,0	0,000	0,000
F ₃	22,0	0,000	0,000

3.1. Herança e herdabilidade

As médias e variâncias do teor de ácido linolênico avaliados nas cinco gerações estudadas encontram-se no Quadro 1. No Quadro 2, apresentam-se as estimativas de variâncias e herdabilidades nas gerações F₂ e F₃.

A simetria da distribuição dos teores de ácido linolênico de sementes F₂ e o número de genes que determinam o caráter são apresentados no Quadro 3.

Os resultados apresentados no Quadro 2 conduzem a uma estimativa negativa de σ_D^2 . Considerou-se, então, que a variância devido aos desvios de dominância é de pequena magnitude, podendo ser desprezada. Em razão disso, assumiu-se que a herdabilidade no sentido restrito é igual à herdabilidade no sentido amplo, e a variância fenotípica da geração F₂ é a seguinte:

$$\sigma^2_{f(F_2)} = \sigma_A^2 + \sigma_e^2$$

Com base nesses resultados, pode-se concluir que 75,02% da variação total na população F₂ foi atribuída à causa genética de natureza aditiva. Esse dado evidencia a viabilidade do uso de métodos simples de melhoramento, com grande possibilidade de ganhos satisfatórios.

Quadro 3 - Média, valores máximo e mínimo, desvio-padrão e simetria da distribuição da população F_2 , bem como número mínimo de genes que determinam o teor de ácido linolênico em sementes

Estatística	Estimativa
Número de indivíduos	357
Média	5,7582
Mínimo	3.1293
Máximo	9,2773
Desvio-padrão	1,3089
Simetria	0,2271 ^{ns}
Número mínimo de genes	~3

^{ns} não significativamente diferente de zero ($P < 0,01$).

Na Figura 1, mostra-se a probabilidade de a distribuição observada em F_2 se ajustar à distribuição normal. Conforme se pode observar nessa figura, os dados se ajustam muito bem à distribuição normal.

Em função dos resultados anteriores, admitiu-se que o grau médio de dominância era zero.

Considerando ausência de dominância ($k = 0$) e utilizando como amplitude total aquela entre as médias dos pais, que é menos influenciada pelo ambiente do que a amplitude observada em F_2 , o número mínimo de genes que controlam o teor de ácido linolênico em soja foi estimado como sendo três (Quadro 3), indicando que a característica é controlada por um pequeno número de genes. Essa evidência é importante para os programas de melhoramento, pois, em relação a características qualitativas, é possível encontrar indivíduos superiores na geração F_2 . Além disso, indica que métodos de melhoramento simples, como retrocruzamentos, podem ser utilizados para incorporar tal característica em cultivares adaptados e produtivos.

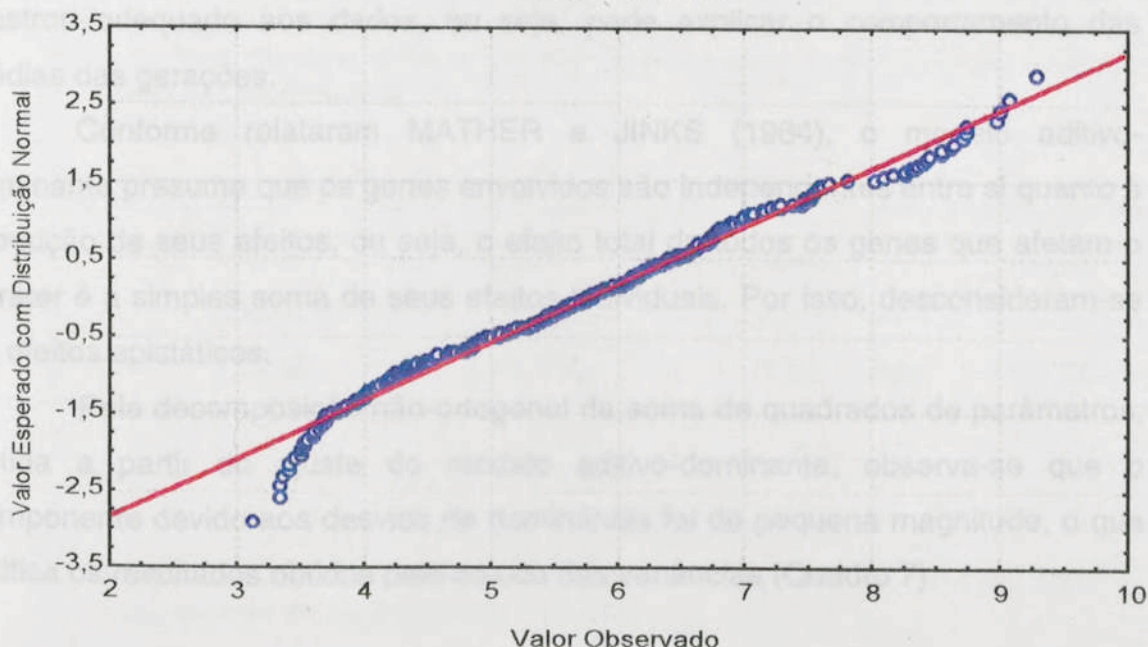


Figura 1 - Probabilidade de os dados observados em F₂ se ajustarem à distribuição normal.

3.2. Informações genéticas obtidas das médias e teste do modelo aditivo-dominante

No Quadro 4 são apresentadas as estimativas dos componentes das médias das gerações, obtidos a partir do modelo completo. Nesse caso, como se consideraram todos os efeitos, os vetores de valores estimados e observados foram idênticos e a determinação (R^2), portanto, foi total.

As estimativas dos efeitos do modelo aditivo-dominante, bem como os testes de significância, encontram-se no Quadro 5. O número de graus de liberdade associado corresponde à soma dos graus de liberdade de cada geração envolvida na estimação do parâmetro.

Com os dados do Quadro 6, pode-se avaliar a adequação do modelo aditivo-dominante, por meio da correlação entre as médias ajustadas e as médias observadas. A correlação encontrada foi de 0,9897, o que equivale a uma determinação (R^2) de 97,96%. Isso mostra que o modelo aditivo-dominante se

mostrou adequado aos dados, ou seja, pode explicar o comportamento das médias das gerações.

Conforme relataram MATHER e JINKS (1984), o modelo aditivo-dominante presume que os genes envolvidos são independentes entre si quanto à produção de seus efeitos, ou seja, o efeito total de todos os genes que afetam o caráter é a simples soma de seus efeitos individuais. Por isso, desconsideram-se os efeitos epistáticos.

Pela decomposição não-ortogonal da soma de quadrados de parâmetros, obtida a partir do ajuste do modelo aditivo-dominante, observa-se que o componente devido aos desvios de dominância foi de pequena magnitude, o que ratifica os resultados obtidos pelo estudo das variâncias (Quadro 7).

Quadro 4 - Estimativas dos parâmetros genéticos, obtidas da análise das médias de cinco gerações de plantas de soja, e teste de significância da nulidade desses parâmetros

Parâmetros	Estimativa	Variância da Estimativa	t	GL	Significância
m	8,5754	0,4597	12,65	404	P<0,001
a	2,8803	0,0096	29,40	40	P<0,001
d	-8,0940	4,7244	-3,72	404	P<0,001
aa	-1,9495	0,4693	-2,85	444	P<0,001
dd	4,9194	2,6907	3,00	404	P<0,001

PV	SC	R (%)
m/a/d	5.189,3309	84,02
a/d/aa	928,4169	15,03
d/aa/dd	59,4520	0,95
Total	6.176,2000	100,00

Quadro 5 - Estimativas dos parâmetros m, a e d, estimados a partir das médias de plantas de soja, e teste de significância para a hipótese de nulidade desses parâmetros

Parâmetros	Estimativa	Variância da Estimativa	t	GL	Significância
m	6,6356	0,0084	72,40	444	P<0,001
a	2,8876	0,0089	30,61	444	P<0,001
d	-1,6246	0,0451	-7,65	444	P<0,001

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Quadro 6 - Médias observadas e estimadas de cinco gerações de soja em relação ao teor de ácido linolênico

Geração	Média Observada	Média Estimada
P1	9,5062	9,5233
P2	3,7455	3,7480
F ₁	5,4007	5,0109
F ₂	5,7582	5,8233
F ₃	6,8594	6,2295

Quadro 7 - Decomposição não-ortogonal da soma de quadrados de parâmetros do modelo aditivo-dominante pelo Método de Eliminação de Gauss

FV	SQ	R ² (%)
m/a,d	5.189,3306	84,02
a/m,d	928,4169	15,03
d/m,a	58,4590	0,95
Total	6.176,2065	100,00

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Com os objetivos de estudar a herança e avaliar a natureza e a magnitude dos efeitos gênicos no teor de ácido linolênico em soja, cruzou-se o acesso BARC-12 com o cultivar comercial CAC-1, originando as populações F₁, F₂ e F₃. Estas populações e os progenitores foram utilizados para estimar alguns parâmetros genéticos.

Os resultados obtidos permitiram a conclusão de que a característica teor de ácido linolênico em soja é controlada por pequeno número de genes. O modelo mais simples, aditivo-dominante, foi satisfatório para explicar as médias das cinco gerações consideradas. As análises evidenciaram, também, que as interações entre genes não alélicos têm pouco efeito na determinação dos valores genotípicos dos indivíduos. Tanto as análises com base em variâncias quanto as com base nas médias das gerações demonstraram que os desvios devido à dominância são de pouca importância para a característica.

Esses resultados permitiram a inferência de que métodos mais simples de melhoramento podem ser utilizados para introduzir a característica baixo teor de ácido linolênico em soja, pois é possível identificar, com precisão, os indivíduos desejáveis em gerações segregantes. Além do mais, método de retrocruzamentos deve permitir rápida incorporação da característica em cultivares adaptados e produtivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo:Edgard Blucher. 1971, 381p.
- ANAND, S.C., TORRIE, J.H. Heritability of yield and other traits interrelationships among traits in F₃ and F₄ generations of three soybeans crosses. **Crop Sci.**, v.3, p.508-511, 1963.
- BUBECK, D.M., FEHR, W.R. HAMMOND, E.G. Inheritance of palmitic and stearic acid mutants of soybean . **Crop Sci.**, v.29, p.652-656, 1989.
- BURTON, G.W. Quantitative inheritance in pearl millet (*Peunisitum glancum*). **Agron. J.**, v. 43, p.42-46, 1951.
- BURTON, J.W., WILSON, R.F. BRIM, C.A. Recurrent selection in soybeans. IV Selection for increased oleic acid percentage in seed oil. **Crop Sci.**, v.23, p.744-747, 1983.
- CRUZ, C.D., REGAZZI, A.J. **Modelo biométrico aplicado ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1994. 390p.
- DOYLE, J.J, DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**,v.12, p.13-15, 1990.
- ECONOMIC implications of modified soybean traits. Ames, Iowa: Iowa Soybean Promotion Board, American Soybean Association, 1990. 88p. (Special Report, 92).
- EVANS, C.D., MOSER, H.A., McCONNEL, D.G. et al. Flavor evolution of natural soybean oil of high and low linolenate content. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.28, n.1, p.115-118, 1965.

- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: UFV, Imprensa Unveristária,. 1987. 279p.
- FEHR, W.R., WELKE. G.A., HAMMOND, E.G. et al. Inheritance of reduced linolenic acid content in soybean genotypes A16 and A17. **Crop Sci.**, v.32, p.903-906, 1992.
- GOLDBERG, R.B., DNA sequence organization in the soybeanplant. **Biochem. Genet.**, v. 16, p.45-68, 1978.
- GRAEF, G.L.,FEHR,W.R., MILLER, L.A. et al. Inheritance of fatty acid composition in a soybean mutant with low linolenic acid. **Crop Sci.**, v.28, p.55-58, 1988.
- GREEN, A.G. Genetic control of polyunsaturated fatty acid biosynthesis in flax (*Linum usitatissimum*) seed oil. **Theor. Appl. Genet.**, v.72, p.654- 61, 1986.
- HAMMOND E. G., FEHR, W.R. Registration of A5 germplasm line of soybean (Reg no GP44). **Crop Sci.**, v.23, p.192,1983.
- HILDEBRAND, D. F. Altering fatty acid metabolism in plants. **Food Tech.**, p.71-74, 1992.
- HILDEBRAND, D. F. Lipoxygenases. **Physiol. Plant.**, v.76, p.249-253, 1989.
- HO, C. T., SMAGULA, M.S., CHANG, S.S. The synthesis of 2-(1-pentenyl) furan and its relationship to the reversion flavor of soybean oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, n.1, v.55, p.233-237, 1978.
- HU, J. QUIROS C., ARUS, P., STRUSS, D., ROBBELEN, G. Mapping of a gene determining linolenic acid concentration in rapeseed with DNA-based markers. **Theor. Appl. Genet.**, v.90, p.258-262, 1995.
- JAWORSKI. J.G., CLOUGH, R.C., BARNUM, S.R. A cerulenin insensitive short chain 3-Ketoacyl-acyl carrier protein synthesis in *Spinacia oleracea* leaves. **Plant Physiol.**, v.90, p.41-44, 1989.
- JOHNSON, H.W., BERNARD, R.L. Soybean, genetics and breeding. In: NORMAN,A.G. (Ed.). **The soybean genetics, breeding, physiology, nutrition and management**. New York: Academic, 1967. p1-73.
- KINNEY, A.J. Genetic modification the storage lipids of plants. **Curr. Opin. in Biotech.**, v.5, p.144-151, 1994.
- LEFFEL, R.C. Registration of BARC-12 a low linolenic acid soybean germplasm line . **Crop Sci.**, v. 34, p.1426-2427, 1994.
- LIU, H.R., WHITE, P.J. Oxidative stability of soybean oil with altered fatty acid compositions. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 69, n.6, p.528-532, 1992.

- MAHUMUD, I., KRAMER, H.H. Segregation for yield, height and maturity following a soybean cross. **Agron. J.**, v. 43, p.605-609, 1951.
- MATHER. K., JINKS, J. L. Introdução à genética biométrica. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1984, 242p.
- MICHELMORE, R.W., PARAN, I., KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.88, p.9828-9832, 1991.
- MOUNTS, T.L., WARNER, K.A., LIST, G.R. et al. Flavors and oxidative stability of hydrogenated and unhydrogenated soybean oils: effects of antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.55, n.3, p.345-349, 1978.
- NEFF, W.E., SELKE, E., MOUNTS, T.L. et al. Effect of triacylglycerol composition and structures on oxidative germoplasm. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.69, n.2, p.111-118, 1992.
- OHLROGGE, J. BROWSE, J. Lipid biosynthesis. **Plant Cell**, v. 7, p.957-970, 1995.
- OSORIO, J., FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, J., MANCHA, M. et al. Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acid in the oil. **Crop Sci.**, v.35, p. 739-742, 1995.
- POST-BEITTELMILLER, ROUGHAN, P.G., OHLROGGE, J.B. Regulation of plant fatty biosynthesis: analysis of acyl-CoA and acyl-ACP substrate pools in spinach and pea chloroplasts. **Plant Physiol.**, v 100, p.923 -930, 1992.
- RAHMAN, S.M, TAKAGI, Y. Inheritance of reduced linolenic acid content in soybean seed oil. **Theor. Appl. Genet.**, v.94, p. 299 -320, 1997.
- RAHMAN, S. M., TAKAGI, Y., KUBOTA, K. et al. High oleic acid mutant in soybean induced by X-ray irradiation. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.58, p.1070-1072, 1994.
- RENNIE, B. D. TANNER, J. W. New allele at the *Fan* locus in the soybean line A5. **Crop Sci.**, v.31, p.297-301, 1991.
- ROUGHAN, P.G., SLACK, C.R. Cellular organization of glycolipid metabolism. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v.33, p.97-132, 1982.
- SCHNEBLY, S.R., FEHR, W.R., WELKE, G.A. et al. Inheritance of reduced and elevated palmitate in mutant lines of soybean. **Crop Sci.**, v.34, p.829-833, 1994.
- SMITH, K.J. Improving the quality of the soybean. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.58, n.2, p.135-139, 1981.

SOMERVILLE, C., BROWSE, J., Plant Lipids: metabolism, mutants, and membranes. **Science**, v.252, p.80-87, 1991.

TÖPFER, R., MARTINI, N., SCHELL, J., Modification of plant lipid synthesis. **Science**, v.268, p.681-685, 1995.

WANG, X.M., HILDEBRAND, D. F. Biosynthesis and regulation of linolenic acid higher plants. **Plant Physiol. Biochem.**, v.26, p.777-792. 1988.

WILCOX, J.R. e CAVINS, J.F. Gene symbol assigned for linolenic acid mutant in the soybean. **J. Hered.**, v.78, p.410 1987.

WILCOX, J.R. e CAVINS, J.F. Inheritance of low linolenic acid content of the seed oil of a mutant in *Glycine max*. **Theor. Appl. Genet.**, v.71, p.74-78. 1985.

WILCOX, J.R., CAVINS, J.R. e NIELSEN, N.C. Genetic alteration of soybean oil composition by a chemical mutagen. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.61, p.97-100. 1984.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A., LIUAK, K.J. et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research.**, v.18, p.6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J. G.K., HANAFEY, M. K., RAFALSKI, J.A. et al. Genetic analysis using RAPD markers. **Mith. Enzymol.**, V.218, p.704-740, p.1993.

WILSON, R.F., BURTON, J. W. BRIM, C. A Progress in the selection for altered fatty acid composition in soybean. **Crop Sci.**, v.21, p.788-791, 1981.

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, 1996, p. 165-188.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 3^a ed. Upper Saddle River, New Jersey. Prentice Hall, 1996. 662p.