



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

THALES PEREIRA BARRETO

**PARTE 1 - MAPEAMENTO DE GENES DE LIPOXIGENASES
PARA USO NA SELEÇÃO ASSISTIDA DE SOJA.**

**PARTE 2 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA
GLICOSILTRANSFERASE IMPLICADAS NA SÍNTESE DE
PRECURSORES DE AROMAS DE TOMATE POR PCR
QUANTITATIVA.**

THALES PEREIRA BARRETO

**PARTE 1 - MAPEAMENTO DE GENES DE LIPOXIGENASES
PARA USO NA SELEÇÃO ASSISTIDA DE SOJA.**

**PARTE 2 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA
GLICOSILTRANSFERASE IMPLICADAS NA SÍNTESE DE
PRECURSORES DE AROMAS DE TOMATE POR PCR
QUANTITATIVA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Carpentieri Pípolo

Co-Orientador: Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor

Londrina
2008

THALES PEREIRA BARRETO

**PARTE 1 - MAPEAMENTO DE GENES DE LIPOXIGENASES
PARA USO NA SELEÇÃO ASSISTIDA DE SOJA.**

**PARTE 2 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA
GLICOSILTRANSFERASE IMPLICADAS NA SÍNTESE DE
PRECURSORES DE AROMAS DE TOMATE POR PCR
QUANTITATIVA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Anne Bernadac – INP/ENSAT

Prof. Dr. Ricardo Antônio Ayub – UEPG

Prof. Dr. Ricardo Ralisch – UEL

Prof. Dr. Sérgio Ruffo Roberto – UEL

Profa. Dra. Valéria Carpentirei Pípolo
Orientadora – UEL

Londrina, 27 de junho de 2008.

DEDICATÓRIA

A Deus, aos meus pais, Clécio e Ilka, meu irmão, Thiago, meus familiares e aos meus amigos companheiros de todas as horas, que quando precisei sempre estiveram presentes na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria muito de agradecer aos meus pais e familiares que sempre me apoiaram e investiram em meus estudos.

Agradeço a minha orientadora Dra. Valéria Carpentieri Pípolo e ao meu co-orientador Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade e investimento pessoal que realizaram para o meu trabalho e para a minha aprendizagem.

A Universidade estadual de Londrina, em especial ao curso de pós-graduação em agronomia, pela oportunidade de realizar os meus estudos.

A Embrapa Soja em especial ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pela disponibilidade de condições técnicas e materiais para a realização do estudo.

Gostaria de agradecer também ao professor Mondher Bouzayen pela acolhida no laboratório de Genômica e biotecnologia de frutas. Agradeço seguidamente Christian Chervin e Ricardo Ayub pelo investimento pessoal que realizaram para o meu trabalho e a minha aprendizagem. Por último, não esqueço das outras pessoas do laboratório que com seu bom humor me facilitaram o trabalho. Tenho também a agradecer particularmente Jean Claude Pech e Alan, por todo o acompanhamento do trabalho, e a Anne Bernadac pela oportunidade e pelo auxílio durante minha estadia.

Aos pesquisadores, da EMBRAPA Soja, José Marcos Gotijo Mandarino e Mercedes Carrão Pannizi pela contribuição no estudo.

Gostaria de agradecer também aos colegas de laboratório (Viera, César, Rodrigo, Amanda, Maria Tereza, Michelli, João Vitor, André Passianoto, André Paulo, Vera, Gabriel, Renata Fuganti, Renata Stolf, Amanda Rusiska, Maria Cecilia, Gustavo, Paula, Selma, Jakeline, Cibelli, Guto, Leidy e Valéria) que contribuíram para a realização do trabalho, em especial a Silvana, Daiana e Lizandra por toda a colaboração.

Aos meus amigos Tiago Zarpelon, Leandro Tenália, Juliano Schneider, Binha, Lênio, Tito, Frabício, Carol, Bruna, Elisa, Dú, Reinaldo e Gustavo que estiveram sempre presentes, colaborando com seu apoio e amizade.

BARRETO, Thales Pereira. **Mapeamento de genes de lipoxigenase para uso na seleção assistida de genótipos de soja com ausência de lipoxigenases.** 2008. 47p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é considerada a principal fonte de proteína vegetal disponível e sua cultura é de grande importância mundial. O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial. A elevada importância sócio-econômica da soja é atribuído principalmente a sua combinação de elevado teor de proteína e óleo juntamente com o rendimento de grãos. Embora a soja seja considerada uma fonte de proteína e óleo de alta qualidade para o alimento e alimentação, os grãos de soja possuem pelo menos três isoenzimas de lipoxigenase, lipoxigenase 1, 2 e 3. Essas três isoenzimas são responsáveis pela produção de odores e sabores desagradáveis nos grãos de soja limitando o desenvolvimento de produtos a base de proteína de soja para o consumo humano. A melhoria desse sabor foi conseguido através de tratamentos térmicos, extração com solventes orgânicos ou decomposição desse sabor por aldeino desidrogenase. Entretanto, estes tratamentos são caros e não inteiramente satisfatórios para matérias alimentícios porque podem diminuir consideravelmente a solubilidade da proteína. A eliminação genética das isoenzimas de lipoxigenase (Lox 1, Lox 2 e Lox 3) dos grãos de soja é uma maneira de superar os problemas associados com o sabor indesejável e a eliminação genética deste sabor pode ser acelerada através do uso de marcadores moleculares ligados a Lox. O objetivo do estudo foi mapear os locus L1, L2 e L3 utilizando marcadores moleculares e conseguir marcadores para realizar a seleção assistida de plantas de soja com ausência das três isoenzimas de lipoxigenases na semente. Foi contruído um mapa baseado em marcadores microssatélites (SSR) usando a população F₂, oriundas do cruzamento entre as variedades BR 36 e BRS 213. Para análise da segregação de F₂ foram considerados apenas dois genes, devido à forte ligação entre o locus L1 e L2. Os resultados foram confirmados pelos valores do teste de qui-quadrado, quando a segregação não foi estatisticamente significativa, ocorrendo de acordo com a segregação esperada, isto é, na disposição de 9:3:3:1 (9 – presença de L1, L2 e L3; 3 – ausência de L1 e L2; 3 – ausência de L3; e 1 – ausência de L1, L2 e L3). A segregação ocorreu também de forma esperada quando considerado os genes separadamente, isto é, na disposição de 3:1 (3 – presença de L1, L2 e L3; 1 – ausência de L1 e L2 ou L3). Os marcadores testados para Lox 1 e 2 apresentaram polimorfismo para os parentais, mas quando testados na população F₂ não apresentaram polimorfismo. Foram encontrados oito marcadores polimorficos para Lox 3 nos grupos de ligação E e M. Baseado no resultado da análise de ligação entre Lox 3 e os marcadores SSR, Lox 3 foi posicionado no grupo de ligação E. Embora os marcadores do grupo de ligação M ter apresentado polomofismo na estava ligado ao locus L3. Dessa forma, podemos dizer que o locus que controla a produção da isoenzima Lox 3 está localizado no grupo de ligação E. O marcador Satt 212 (SSR) foi integrado ao mapa de ligação obtido para o locus L3 definido a partir da população F₂. Esse marcador está a uma distância de 24,1 cM da Lox 3.

Palavras-chave: Melhoramento. *Glycine Max*. Marcadores moleculares. Lox. Sabor desagradável.

BARRETO, Thales Pereira. **Mapping of genes for use in the genotypes' assisted selection of soybean without lipoxygenase.** 2008. 47f. Dissertation (Master degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill has been considered the main available source of vegetable protein and its culture has a worldwide relevance. Brazil is the second biggest producer and worldwide exporter. The high socioeconomic importance of soybean is mainly attributed to its much favorable combination of high protein and oil contents together with appropriate seed yield. Although soybean is considered a high quality source of oil and protein for food and feed, the soybean seeds contain at least three lipoxygenase isozymes, lipoxygenases 1, 2, and 3 (L1, L2, and L3). These isozymes are responsible for the production of unpleasant grassy and beany flavors in soybean seeds that have limited the development of soybean protein products for human consumption. Flavor improvement of soybean has been achieved through heat treatment, extraction with organic solvents or decomposition of beany flavor by aldehyde dehydrogenase. However, these treatments are expensive and not entirely satisfactory for food materials, because it may considerably decrease protein solubility. The genetic elimination of lipoxygenase (Lox 1, Lox 2 and Lox 3) enzymes from soybean seeds is a way to overcome the problems associated with the undesirable beany flavor of soybean seeds and genetic elimination of this flavor can be accelerated by using of molecular markers linked to Lox. The objective of this study was to map the L1, L2 and L3 loci and identify any markers to achieve in marker-assisted selection of plants lacking the three lipoxygenases in the seeds. A frame map based on simple sequence repeat (SSR) markers was constructed using a F₂ population of BR 36 X BRS 213. To the segregation analysis of F₂ was considered only two genes, due to the strong link between L1 and L2 loci. It was considered two genes segregating, due to the strong link between L1 and L2 loci. The results were confirmed by the chi-square test values, when the segregation was not statistically significant, occurring in accordance with the waited segregation and disposal 9:3:3:1 (9 - L1, L2 and L3 presence; 3 - L1 and L2 absence; 3 - L3 absence; and 1 - L1, L2 and L3 absence). When the genes were considered separately the segregation also occurred in waited pattern 3:1 disposal (3 - L1, L2 and L3 presence; 1 - L1 and L2 or L3 absence). Although the parental lines showed polymorphism for the tested markers for Lox 1 and 2 the F₂ population did not presented polymorphism. Eight polymorphic markers were found for Lox 3 in the linkage group E and M. Based on the results of linkage analysis between Lox3 and the SSR markers, Lox 3 was found to be positioned on Linkage group E. Although markers from linkage group M had presented polymorphism they remained unlinked to locus L3. Regarding this, we can say that the locus responsible for the control of the isozyme Lox 3 is placed on the E link group. The Satt 212 marker (SSR) was integrated into the frame map obtained for locus L3 defined from the F₂ population. This marker is 24.1 cM from locus Lox 3.

Keywords: Breeding. *Glycine Max*. Molecular markers. Lox. Beany flavor.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 SOJA NA ALIMENTAÇÃO	10
2.2 LIPOXIGENASE EM SOJA	11
2.2.1 Herança das lipoxigenases em soja	11
2.3 MARCADORES MOLECULARES E MAPEAMENTO	13
2.4 SELEÇÃO ASSISTIDA	16
PARTE 1	18
3 ARTIGO A: MAPEAMENTO DE GENES DE LIPOXIGENASE PARA USO NA SELEÇÃO ASSISTIDA DE SOJA	19
3.1 RESUMO E ABSTRACT	19
3.2 INTRODUÇÃO	20
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3.5 CONCLUSÕES	30
PARTE 2	31
4 ARTIGO B: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA GLICOSILTRANSFERASE IMPLICADAS NA SÍNTESE DE PRECURSORES DE AROMAS DE TOMATE POR PCR QUANTITATIVA	32
4.1 RESUMO, ABSTRACT E RESUMÉ	32
4.2 INTRODUÇÃO	33
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.4 RESULTADOS	36
4.5 CONCLUSÕES	39
4.6 REFERÊNCIAS	39
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa importante na alimentação humana e animal graças às suas características nutricionais. Entretanto, sua utilização é limitada pela presença de fatores antinutricionais e presença de algumas enzimas.

É uma planta de origem oriental consumida nos países asiáticos. É uma das principais fontes de matéria prima para a extração de óleo vegetal comestível usada na alimentação humana.

A produção de soja no Brasil aumentou 128% nos últimos 10 anos (1995 – 2005), passando de 23,2 milhões para 51,7 milhões de toneladas e hoje atinge 59,9 milhões de toneladas (CONAB, 2008). Esse aumento de produção aconteceu devido ao aumento da área cultivada, que passou de 10,6 para 23,1 milhões de hectares e ao aumento da produtividade (2,14% ao ano). O Brasil é líder em tecnologias para produção de soja nos trópicos e também o principal exportador de farelo de soja (32% do mercado mundial), o que significa uma exportação considerável de proteína de ótima qualidade. O mercado interno se concentra no consumo de óleo e ração animal. Entretanto, o consumo direto de soja entre os brasileiros está aumentando em decorrência da divulgação dos benefícios da soja para a saúde humana, bem como do crescimento na oferta de produtos à base de soja de melhor qualidade no mercado (CARRÃO-PANIZZI, 2006).

No Brasil, o mercado de alimentos à base de soja ainda é recente e o segmento de bebidas elaboradas à base de soja é o que mais tem crescido. Em 2005, o consumo de bebidas de soja cresceu 60% e o segmento de alimentos à base de soja movimentou cerca de 23 milhões de dólares em 2001. Há estimativas de que possa chegar a mais de dois bilhões até em 2020 (CARRÃO-PANIZZI, 2006).

Nos últimos anos foram lançados cultivares de soja com características especiais para o consumo *in natura* e para a indústria de alimentos, em razão da demanda por produtos com maior valor agregado. Para essa linha de produtos são consideradas diversas características, tais como: sementes grandes com alto teor de proteína e coloração clara do hilo que conferem boa qualidade organoléptica aos produtos de soja, ausência das enzimas lipoxigenases responsável por sabor mais suave aos produtos, teor reduzido do inibidor de tripsina Kunitz que permite a redução de tratamento térmico e dos custos de processamento, bem como, tamanho, coloração e textura de sementes (EMBRAPA, 2004).

Apesar da soja possuir bom valor nutritivo, seus produtos sofrem restrições por parte dos consumidores ocidentais, devido ao sabor característico denominado “beany flavor”. O “beany flavor” é originado pela ação das isoenzimas lipoxigenases (Lox). Essas enzimas constituem cerca de um por cento do total de proteínas presentes no grão de soja. O tratamento térmico tem sido usado para melhorar esse sabor indesejável da soja. Uma forma de resolver esse problema é a eliminação genética dessas enzimas, por meio do melhoramento genético.

A principal finalidade da seleção assistida por marcadores no melhoramento vegetal é auxiliar a seleção de genótipos desejáveis, com máxima eficiência, rapidez e com baixo custo.

Em soja, como em outras culturas, marcadores moleculares de DNA vêm sendo usados com sucesso, tanto no mapeamento de regiões genômica associadas a locus qualitativos, quanto na seleção de genótipos desejáveis. Os marcadores moleculares mais usados no melhoramento da soja tem sido o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) ou polimorfismo de DNA amplificado ao acaso, na tradução para o português, e os microssatélites ou SSR (*Simple Sequences Repeats*). Ambos são marcadores extremamente práticos, simples e requerem pequena quantidade de DNA, permitindo que dezenas de plantas sejam analisadas de uma só vez.

Os marcadores microssatélites são muito atrativos aos melhoristas vegetais, por combinarem muitas vantagens, entre elas sua natureza codominante e multialélica, elevado polimorfismo, abundância e uniformidade em todo o genoma de plantas e análise por reação de polimerase em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Random*).

O objetivo do estudo foi mapear os locus L1, L2 e L3 utilizando marcadores moleculares microssatélites para realizar a seleção assistida de plantas de soja com ausência das isoenzimas de lipoxigenases na população F₂, oriundas do cruzamento entre as variedades BR 36 e BRS 213.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SOJA NA ALIMENTAÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é considerada a principal fonte de proteína vegetal disponível e sua cultura é de grande importância mundial. O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial, com uma área cultivada de aproximadamente 21 milhões de hectares e uma produção de 59,9 milhões de toneladas de grãos na safra 2007/2008 (CONAB, 2008).

É uma leguminosa importante na alimentação humana e animal, graças às suas características nutricionais. Entretanto, sua utilização é limitada pela presença de fatores antinutricionais e presença de algumas enzimas.

O consumo de alimentos a base de soja cresceu muito nos últimos anos entre os brasileiros e as perspectivas para expansão do setor são ótimas. No Brasil parte da produção de soja tipo alimento é destinado à exportação, e do montante que fica no mercado interno boa parte é transformado em extrato solúvel, um dos principais ingredientes de bebidas à base de soja (BBS) e polpa de frutas. Apenas uma pequena parte é usada para o consumo direto dos grãos (SILVA, 2008).

Nos últimos anos, com a crescente demanda pela soja tipo alimento ocorreu um grande avanço nas pesquisas com este tipo de soja no Brasil. Já existem estudos com aplicação de marcadores moleculares microssatélites na caracterização de cultivares tipo alimento (GARCIA et al., 2007).

A adoção de cultivares com características nutricionais diferenciadas resultará na agregação de maior valor aos grãos e produtos derivados. Este fato tem motivado a criação de novas linhas de pesquisas nos programas de melhoramento e também, estimulado a diversificação e o crescimento das indústrias de sementes e de processamento de produtos à base de soja no Brasil (SILVA, 2008).

2.2 LIPOXIGENASES DA SOJA

Os grãos de soja são utilizados em vários setores, merecendo destaque o setor alimentício, uma vez que são ricos em óleo e proteína de baixo custo e possuem alto valor nutricional. Porém, os produtos protéicos derivados dos grãos da soja não têm boa aceitação no mercado consumidor ocidental, em virtude do sabor e odor característicos (MARTINS et al., 2002).

Como mencionado anteriormente, as isoenzimas Lox são as maiores responsáveis por tais características. As Lox são enzimas que catalisam a adição de oxigênio molecular aos ácidos graxos poliinsaturados, que contém o sistema cis, cis - 1,4 – pentadieno, dos grãos de soja (AXELROD et al., 1981; MACK et al., 1987). Sendo um dos principais fatores responsáveis pelo aparecimento dos compostos carbonílicos, os quais causam o sabor desagradável em grãos (LANZA, 1995).

As Lox estão presentes nas sementes de soja em três formas distintas (Lox 1, 2 e 3). Os alelos que determinam a ausência dessas isoenzimas em sementes de soja são recessivos e possuem herança mendeliana simples (KITAMURA, 1984). Essas isoenzimas são expressas somente durante a maturação da semente, e encontram-se acumuladas em altos teores no embrião, sendo diferentes das isoenzimas de lipoxigenase expressas nos tecidos em estádios mais avançados do desenvolvimento (HILDEBRAND et al., 1991; PIAZZA, 1996).

2.2.1 Herança das lipoxigenases em soja

Mutantes de lipoxigenase com acessos independentes simples para a ausência de (nulo) Lox 1, Lox 2 e Lox 3 foram selecionados na coleção de germoplasma de soja (KITAMURA, 1984; HILDEBRAND; HYMOWITZ, 1981). Davies e Nielsen (1987) retrocruzaram alelos nulos de lipoxigenase com a cultivar de soja “Century”, produzindo três linhas simples nulo retrocruzadas e duas linhas duplo nulo do cruzamento (Lox 1 e 3 e Lox 2 e 3 nulos). O terceiro duplo nulo (Lox 1 e 2 nulos) e linhas triplo nulo não foram produzidos e como a ligação de Lox 1 e Lox 2 nunca havia sido quebrada acreditava-se que a ligação fosse muito forte ou que a ausência de Lox 1 e Lox 2 fosse letal (KITAMURA, 1984). Entretanto,

Hajika et al. (1991) por meio de mutação realizado por radiação com raio- γ em sementes de soja obteve um mutante triplo nulo. Isso indicou que o Lox 1, 2 ou o triplo nulo não são letais.

A atividade da lipoxigenase nos mutantes triplo nulo durante a maturação da semente é extremamente reduzida (WANG et al., 1994). A ausência das três isoenzimas de lipoxigenase não influencia no desempenho da soja para caracteres agronômicos e composição da semente (NARVEL et al., 1998).

A partir do cDNA foram completamente seqüenciadas as regiões das três lipoxigenases (SHIBATA et al., 1987; SHIBATA et al., 1988; YENOFISKY et al., 1988; START et al. 1986). Todos os três tipos de lipoxigenase das sementes apresentaram um alto nível de homologia com pelo menos 70% de igualdade na seqüência de aminoácidos observado por Shibata et al. (1987). Em relação a Lox 1 e 2 que são particularmente homólogas, Shibata et al. (1988) e Yenofsky et al. (1988) observaram 81% de igualdade na seqüência de aminoácidos.

Muitos pesquisadores utilizando retrocruzamentos têm obtido linhagens com ausência de lipoxigenases nas sementes, melhorando as características organoléptica da soja e de seus derivados e alcançando maior aceitação pelo consumidor (SEDIYAMA et al., 1998).

O desenvolvimento de cultivares triplo nulo exige procedimentos para testar e selecionar os genótipos desejados. Suda et al. (1995) desenvolveram um teste colorimétrico para selecionar os genótipos com ausência das lipoxigenase, detectando ausência na atividade de cada isoenzima. Seu procedimento utilizou farinha de soja homogeneizada de amostras de semente para selecionar as lipoxigenases por meio de uma solução detectora. A especificidade do teste para o L1, L2 ou o teste L3 é baseado no pH da solução do teste e na descoloração do β -caroteno em presença de lipoxigenase. Embora os ensaios desenvolvidos por Suda et al. (1995) fossem eficazes, a duração exigida e os materiais necessários para preparar a farinha de soja homogeneizada foram fatores limitantes para analisar um grande número amostras em um programa de melhoramento.

Martins et al. (2002) está utilizando marcadores de DNA para a identificação e seleção de linhagens sem lipoxigenases nas sementes de soja no Programa de Melhoramento da Qualidade e do Sabor da Semente de Soja da Universidade Federal de Viçosa.

O uso de marcadores moleculares é também justificado em situações em que o fenótipo é de difícil mensuração. É o caso da resistência a nematóides, que é determinada

pelo exame direto de cistos na raiz. Resistência a nematóide foi uma das primeiras características associadas a um marcador molecular (RICK; FOBES, 1974).

2.3 MARCADORES MOLECULARES E MAPEAMENTO

A soja tem um genoma relativamente grande ($1,12 \times 10^9$ pb em ARUMUGANATHAN; EARLE, 1991; $1,81 \times 10^9$ pb em GOLDBERG, 1978 e $1,29 \times 10^9$ pb em GURLEY et al., 1979). Aproximadamente 55% dele consiste em seqüências altamente repetitivas (DANESH et al., 1998). Esforços para decifrá-lo foram conduzidos em vários aspectos, incluindo a construção de mapa de ligação, localização da posição de locus agronomicamente importantes com marcadores de DNA e clonagem baseada em mapas.

Os mapas de ligação da soja foram construídos baseados principalmente em polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphisms* – RFLP) usando clones genômicos aleatórios como sonda (KEIM et al., 1990, LARK et al., 1993; SHOEMAKER; SPECHT, 1995; MANSUR et al., 1996). Entretanto, o grau relativamente baixo de polimorfismo, o grande tamanho e a complexidade do genoma retardaram a construção e organização dos mapas de ligação que pudessem cobrir uma grande região do genoma da soja.

Define-se por marcadores moleculares “todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso”, como no caso das isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondentes a regiões expressas ou não do genoma). Ao se verificar o seu comportamento de acordo com as leis básicas de herança de Mendel, um marcador molecular é adicionalmente definido como marcador genético (CATELLI, 2005).

Marcadores do DNA foram inicialmente utilizados no melhoramento de plantas no início da década de 80 (SOLLER; BECKMANN, 1983). Resumidamente, são segmentos de DNA que estão fisicamente ligados a locus que determinam características de interesse.

Podem ser evidenciados por métodos que combinam o uso de enzimas de restrição à hibridização entre seqüências complementares de DNA, como no caso do RFLP ou pela técnica de PCR.

Com o surgimento da técnica de PCR, aliou-se o poder da informação gerada por marcadores moleculares com a rapidez baseada em ciclos contínuos de

desnaturação e amplificação das fitas de DNA. Uma vez que são mediadas pela enzima de DNA polimerase em pontos específicos do genoma e determinadas pelo anelamento de *eliciadores* (seqüência de nucleotídeos de tamanhos pequenos, variando geralmente entre 20 a 30 bases) específicos de seqüências complementares a este ponto. Várias outras técnicas utilizam o princípio da técnica de PCR, tais como os marcadores RAPD (WILLIAN et al., 1990), marcadores de regiões amplificadas caracterizadas por seqüências (*Sequence Characterized Amplified Regions* – SCAR, PARAN; MICHELMORE, 1993), marcadores SSR (LITT; LUTTY, 1989), marcadores de polimorfismo de comprimentos de fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism* – AFLP, VOS et al., 1995) e os SNP's (COLLINS et al., 1998).

Os marcadores moleculares estão sendo utilizados em estudos com soja para construção de mapa de ligação (MORGANTE; OLIVEIRA, 1994; MAUGHAN et al., 1995). Dentre esses marcadores, os SSR se destacam por possuir o mais elevado conteúdo de informações de polimorfismo e por isso, toda e qualquer população em segregação pode ser utilizada como população referência para estudos de ligação e mapeamento genético (FERREIRA; GRATTAOAGLIA, 1998), tais como: populações RILs (linhagens puras recombinantes), populações F_2 e populações de retrocruzamentos. Assim o uso destes marcadores transformou-se numa das principais ferramentas para a análise do genoma das plantas, incluindo a soja. Os SSR foram integrados aos mapas de ligação RFLP por Akkaya et al. em 1995. Cregan et al. (1999) integrou aos mapas de ligação da soja 20 grupos de ligações homólogas usando os marcadores SSR, baseados em sua correspondência com alguns mapas de ligação conhecidos.

A informação genética é maximizada com a utilização de populações segregantes do tipo F_2 , desenvolvida por autofecundação (ou por intercruzamento, no caso de espécies de polinização cruzada) entre indivíduos F_1 . Cada tipo de população utilizada no mapeamento apresenta uma proporção de segregação alélica específica nos locus analisados. O conhecimento dessas proporções é importante para determinar se a população está expressando uma segregação de acordo com o esperado (proporções Mendeliana) em cada locus. Se o locus for um marcador codominante segregando nos três tipos de populações (retrocruzamento, RIL e F_2), a proporção de segregação esperada será, respectivamente, 1:1, 1:1 e 1:2:1. Se o marcador for dominante, as proporções esperadas serão, respectivamente, 1:1, 1:1 e 3:1.

O desenvolvimento de novos marcadores baseados em polimorfismo de SSR e dos polimorfismos de único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphisms* – SNPs) tem permitido construir mapas saturados de alta densidade (HARADA; XIA, 2004).

A integração de locus de caracteres em mapas moleculares de ligação é importante para a seleção assistida por marcadores nos programas de melhoramentos e para a clonagem dos genes responsáveis para características agronômicas importantes. Muitos desses locus já foram incluídos, tais como características que diferenciam variedades (cor de flor, de cotilédones, entre outros), resistência a doenças e fatores nutricionais, entre outros.

Os constituintes da semente são muito importantes na soja e análises genéticas com marcadores de DNA foram relatadas para esses constituintes, tais como: teor de proteína (SEBOLT et al., 2000; CHUNG et al., 2003; TAJUDDIN et al., 2003; ZHANG et al., 2004) e teor de óleo (MANSUR et al., 1993; CHUNG et al., 2003; TAJUDDIN et al., 2003).

Alguns marcadores moleculares disponíveis no mapa do genoma da soja (CREGAN et al., 1999; SONG et al., 2004) vêm sendo utilizados para a identificação de QTL (locus de caráter quantitativo), visando seu emprego na seleção assistida em programas de melhoramento de soja. Por meio de marcadores do tipo microssatélites, Meksem et al. (2001) identificaram regiões genômicas relacionadas com a produção de isoflavonóides. Schuster et al. (2001) mapearam quatro marcadores SSR ligados ao QTL de resistência ao nematóide do cisto (*Heterodera glycine*).

Kim M.Y. et al. (2004), Kim Y.S. et al. (2006) e Reinprecht et al. (2006) identificaram as regiões relacionadas com os locus de lipoxigenases. Segundo esses autores as Lox 1 e 2 estão localizadas em um grupo de ligação diferente da Lox 3, mas há discordância entre os autores quanto à posição de Lox 3.

A seleção assistida por marcadores moleculares é a área que possui maior impacto dentro dos programas de melhoramento na atualidade. Constitui-se em um processo rápido, eficiente e seguro, sendo de fundamental importância para o processo de desenvolvimento de novos cultivares.

2.4 SELEÇÃO ASSISTIDA

O uso de Seleção Assistida por Marcadores Moleculares (SAM) baseia-se no princípio de que, se um gene ou conjunto de genes está associado a um marcador molecular de fácil identificação, então a seleção para este marcador será mais eficiente do que para a própria característica (HAYWARD et al., 1994). A SAM consiste de dois passos principais: identificação de associações entre locus marcadores e QTLs e o uso dessas associações para o desenvolvimento de populações melhoradas (DUDLEY, 1993). Entretanto, a SAM deve ser encarada como uma ferramenta auxiliar e não substituta dos métodos tradicionais de melhoramento (LANDE; THOMPSON, 1990).

Koning e Weller (1994) destacaram que o uso da SAM estava restrito àquelas culturas ou animais de grande interesse econômico e que possuíam grande informação em termos genômicos, onde eram conhecidos marcadores genéticos segregantes. Atualmente, o interesse pela utilização da SAM em diferentes culturas tem sido crescente, principalmente devido ao advento de novas tecnologias genômicas, destacando-se aquelas baseadas em PCR.

A utilização da SAM pode auxiliar no progresso genético dentro de um programa de melhoramento obtendo maior intensidade de seleção, reduzindo o intervalo de gerações, aumentando a eficiência de avaliação e direcionando os cruzamentos complementares entre os indivíduos (WELLER; FERNANDO, 1991).

A aplicação mais concreta de marcadores moleculares atualmente tem sido vista na aceleração de programas de introgressão via retrocruzamento, onde se monitora a presença do gene que se deseja introduzir nas sucessivas gerações de retrocruzamento utilizando-se marcadores fortemente ligados (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

O maior impacto da tecnologia de seleção assistida por marcadores é esperado para características quantitativas e deve ser avaliado considerando-se, simultaneamente, a intensidade de seleção, a herdabilidade, correlações genéticas, duração de uma geração de melhoramento (seleção e recombinação) e o custo de cada alternativa, caso a caso (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). A utilização desta ferramenta em programas de melhoramento de espécies perenes (florestais e frutíferas) é muito atraente, tendo em vista o tempo necessário para se completar uma geração de melhoramento.

Marcadores microssatélites têm sido preferidos a outros tipos de marcadores, pois utilizam a agilidade da técnica de PCR e estão espalhados ao acaso no genoma com uma frequência relativamente alta (AKKAYA et al., 1992). As vantagens da

utilização de microssatélites em relação a outros marcadores moleculares são a fácil exequibilidade (uma vez disponíveis iniciadores para a espécie em estudo), o alto polimorfismo e a boa distribuição no genoma (HOFFMANN, 2006).

Os marcadores baseados em SSR são os que mais se aproximam do marcador ideal para estudos genéticos, por detectarem seqüências repetidas de um a quatro nucleotídeos. Essas seqüências e adjacentes são compostas de mono, di, tri e tetra nucleotídeos repetidos em número variável de vezes (SHARMA et al., 1995). Esses segmentos são amplificados via PCR, com iniciadores específicos de 20 a 30 bases, complementares a seqüências que flanqueiam a região repetitiva (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Por um lado os marcadores microssatélites apresentam um grande número de alelos. Por outro, cada reação possibilita acessar somente um locus (baixa capacidade multiplex). Contudo, apresentam uma alta proporção de locus polimórficos (FERREIRA, 1996).

A produção de iniciadores para a amplificação de microssatélites é uma etapa trabalhosa e onerosa do processo. Considerando que não existem iniciadores comercialmente disponíveis desenhados para todas as espécies vegetais, conta-se com a possibilidade de utilizar iniciadores desenhados para plantas de táxons relacionados (ECHT et al., 1999), sendo essa uma forma de tornar mais barata e mais rápida a análise de microssatélites de uma nova espécie. Estudos recentes revelaram a capacidade de transferibilidade desses iniciadores. Por transferibilidade entende-se a capacidade que os iniciadores desenvolvidos para uma espécie tem em também amplificar segmentos de DNA em outras espécies.

PARTE 1

Artigo A

Mapeamento de genes de lipoxigenase para uso na seleção assistida de soja.

Mapping of genes for use in the assisted selection of soybean.

3 Mapeamento de genes de lipoxigenase para uso na seleção assistida de soja.

3.1 RESUMO E ABSTRACT

Resumo

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é considerada a principal fonte de proteína vegetal disponível e sua cultura é de grande importância mundial. O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial. Embora a soja seja considerada uma fonte de proteína e óleo de alta qualidade para o alimento e alimentação, os grãos de soja possuem pelo menos três isoenzimas de lipoxigenase, lipoxigenase 1, 2 e 3 (L1, L2 e L3). Essas três isoenzimas são responsáveis pela produção de odores e sabores desagradáveis nos grãos de soja limitando o desenvolvimento de produtos a base de proteína de soja para o consumo humano. O objetivo do estudo foi mapear os locos L1, L2 e L3 utilizando marcadores moleculares e conseguir marcadores para realizar a seleção assistida de plantas de soja com ausência das três isoenzimas de lipoxigenases na semente. Foi contruído um mapa baseado em marcadores microssatélites (SSR) usando a população F₂, oriundas do cruzamento entre as variedades BR 36 e BRS 213. Para análise da segregação de F₂ foram considerados apenas dois genes, devido à forte ligação entre o locus L1 e L2. Os resultados foram confirmados pelos valores do teste de qui-quadrado, quando a segregação não foi estatisticamente significativa, ocorrendo de acordo com a segregação esperada, isto é, na disposição de 9:3:3:1 (9 – presença de L1, L2 e L3; 3 – ausência de L1 e L2; 3 – ausência de L3; e 1 – ausência de L1, L2 e L3). Os marcadores testados para Lox 1 e 2 apresentaram polimorfismo para os parentais, mas quando testados na população F₂ não apresentaram polimorfismo. Foram encontrados oito marcadores polimórficos para Lox 3 nos grupos de ligação E e M. Baseado no resultado da análise de ligação entre Lox 3 e os marcadores SSR, Lox 3 foi posicionado no grupo de ligação E. O marcador Satt 212 (SSR) foi integrado ao mapa de ligação obtido para o locus L3 definido a partir da população F₂. Esse marcador está a uma distância de 24,1 cM da L3.

Palavras-chave: Melhoramento, *Glycine max*, Marcadores moleculares, Lox.

Abstract

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) has been considered the main available source of vegetable protein and its culture has a worldwide relevance. Brazil is the second biggest producer and worldwide exporter. Although soybean is considered a high quality source of oil and protein for food and feed, the soybean seeds contain at least three lipoxygenase isozymes, lipoxygenases 1, 2, and 3 (L1, L2, and L3). These isozymes are responsible for the production of unpleasant grassy and beany flavors in soybean seeds that have limited the development of soybean protein products for human consumption. The objective of this study was to map the L1, L2 and L3 loci and identify any markers to achieve in marker-assisted selection of plants lacking the three lipoxygenases in the seeds. A frame map based on simple sequence repeat (SSR) markers was constructed using a F₂ population of BR 36 X BRS 213. To the segregation analysis of F₂ was considered only two genes, due to the strong link between L1 and L2 loci. It was considered two genes segregating, due to the strong link between L1 and L2 loci. The results were confirmed by the chi-square test values, when the segregation was not statistically significant, occurring in accordance with the waited segregation and disposal 9:3:3:1 (9 - L1, L2 and L3 presence; 3 - L1 and L2 absence; 3 - L3 absence; and 1 - L1, L2 and L3 absence). Although the parental lines showed polymorphism for the tested markers for Lox 1 and 2 the F₂ population did not presented polymorphism. Eight polymorphic markers were found for Lox 3 in the linkage group E and M. Based on the results of linkage analysis

between Lox3 and the SSR markers, Lox 3 was found to be positioned on Linkage group E. Although markers from linkage group M had presented polymorphism they remained unlinked to locus L3. The Satt 212 marker (SSR) was integrated into the frame map obtained for locus L3 defined from the F₂ population. This marker is 24.1 cM from locus Lox 3.

Key-words: Breeding, *Glycine max*, Molecular markers, Lox.

3.2 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é considerada a principal fonte de proteína vegetal disponível e sua cultura é de grande importância mundial. O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial com uma área cultivada de aproximadamente 21 milhões de hectares e uma produção de 59,9 milhões de toneladas de grãos na safra 2007/2008 (CONAB, 2008).

Nos últimos anos foram lançados cultivares de soja com características especiais para o consumo *in natura* e para a indústria de alimentos, em razão da demanda por produtos com maior valor agregado. Para essa linha de produtos são consideradas diversas características, tais como: sementes graúdas com alto teor de proteína e coloração clara do hilo que conferem boa qualidade organoléptica aos produtos de soja, ausência das enzimas lipoxigenases responsável por sabor mais suave aos produtos, teor reduzido do inibidor de tripsina Kunitz que permite a redução de tratamento térmico e dos custos de processamento, bem como, tamanho, coloração e textura de sementes (EMBRAPA, 2004).

Os grãos de soja são utilizados em vários setores, merecendo destaque o setor alimentício, uma vez que são ricos em óleo e proteína de baixo custo e possuem alto valor nutricional. Porém, os produtos protéicos derivados dos grãos de soja não têm boa aceitação no mercado consumidor ocidental, em virtude do sabor e odor característicos (MARTINS et al., 2002).

As isoenzimas de lipoxigenases (Lox) são as maiores responsáveis por tais características. As Lox são enzimas que catalisam a adição de oxigênio molecular aos ácidos graxos poliinsaturados, que contém o sistema cis, cis - 1,4 – pentadieno, dos grãos de soja (Axelrod et al., 1981; Mack et al., 1987). Sendo um dos principais fatores responsáveis pelo aparecimento dos compostos carbonílicos, os quais causam o sabor desagradável em grãos (Lanza, 1995).

As Lox estão presentes nas sementes de soja em três formas distintas (Lox 1, 2 e 3). Os alelos que determinam a ausência dessas isoenzimas em sementes de soja são recessivos e possuem herança mendeliana simples (KITAMURA, 1984). Essas isoenzimas

são expressas somente durante a maturação da semente, e encontram-se acumuladas em altos níveis no embrião, sendo diferentes das isoenzimas de lipoxigenase expressas nos tecidos em estágios mais avançados do desenvolvimento (HILDEBRAND et al., 1991; PIAZZA, 1996).

A atividade da lipoxigenase nos mutantes triplo nulo durante a maturação da semente é extremamente reduzida (WANG et al., 1994). A ausência das três isoenzimas de lipoxigenase não influencia no desempenho da soja para caracteres agronômicos e composição da semente (NARVEL et al., 1998).

Nos últimos anos, com a crescente demanda pela soja tipo alimento ocorreu um grande avanço nas pesquisas com este tipo de soja no Brasil. Já existem estudos com aplicação de marcadores moleculares microssatélites na caracterização de cultivares tipo alimento (GARCIA et al., 2007).

A soja tem um genoma relativamente grande ($1,12 \times 10^9$ pb em ARUMUGANATHAN; EARLE, 1991; $1,81 \times 10^9$ pb em GOLDBERG, 1978 e $1,29 \times 10^9$ pb em GURLEY et al., 1979). Aproximadamente 55% dele consiste em seqüências altamente repetitivas (DANESH et al., 1998). Esforços para decifrá-lo foram conduzidos em vários aspectos, incluindo a construção de mapa de ligação, localização da posição de locus agronomicamente importantes com marcadores de DNA e clonagem baseada em mapas.

Os marcadores moleculares estão sendo utilizados em estudos com soja para construção de mapas de ligação (MORGANTE; OLIVEIRA, 1994; MAUGHAN et al., 1995). Dentre esses marcadores, os SSR se destacam por possuir o mais elevado conteúdo de informações de polimorfismo e por isso, toda e qualquer população em segregação pode ser utilizada como população referência para estudos de ligação e mapeamento genético (FERREIRA; GRATTAOAGLIA, 1998), tais como: populações RILs (linhagens puras recombinantes), populações F_2 e populações de retrocruzamentos. Assim o uso destes marcadores transformou-se numa das principais ferramentas para a análise do genoma das plantas, incluindo a soja. Os SSR foram integrados aos mapas de ligação RFLP por Akkaya et al. em 1995. Cregan et al. (1999) integrou aos mapas de ligação da soja 20 grupos de ligações homólogas usando os marcadores SSR, baseados em sua correspondência com alguns mapas de ligação conhecidos.

O desenvolvimento de novos marcadores baseados em polimorfismo de SSR e dos polimorfismos de único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphisms* – SNPs) tem permitido construir mapas saturados de alta densidade (HARADA; XIA, 2004).

Kim M.Y. et al. (2004), Kim Y.S. et al. (2006) e Reinprecht et al. (2006) identificaram as regiões relacionadas com os locus de lipoxigenases. Segundo esses autores as

Lox 1 e 2 estão localizadas em um grupo de ligação diferente da Lox 3, mas há discordância entre os autores quanto à posição de Lox 3.

O objetivo do estudo foi mapear os locus L1, L2 e L3 utilizando marcadores moleculares microssatélites para realizar a seleção assistida de plantas de soja com ausência das isoenzimas de lipoxigenases na população F₂, oriundas do cruzamento entre as variedades BR 36 e BRS 213.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Os genótipos parentais selecionados foram BRS 213 (BR94-23354 x BR94-23321) e BR 36 (IAS 4 (2) x BR78-22043), sendo que o primeiro se caracteriza por ter ciclo precoce, crescimento determinado, hilo amarelo, flor branca e ausência das enzimas lipoxigenases (EMBRAPA SOJA, 2005) e o segundo por ter ciclo médio, hilo marrom-claro, flor branca, presença de lipoxigenases e alto teor de proteína (ALMEIDA et al. 1999).

Os cruzamentos artificiais entre os genótipos parentais foram realizados em casa de vegetação na Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina-PR, na safra de 2003/2004. As sementes F₁ originadas foram semeadas em vaso para o avanço de geração em casa de vegetação nos meses de setembro e outubro de 2004 e a colheita foi realizada manual e individualmente nos meses de dezembro de 2004 e janeiro de 2005.

Análise química

Foram avaliadas 168 sementes F₂ em relação à ausência das três lipoxigenases, através do método colorimétrico (SUDA et al., 1995) modificado por Kikuchi (2001), que se baseia na descoloração do β -caroteno em presença das lipoxigenases e no pH. A presença ou ausência das enzimas de lipoxigenase é determinada pela coloração, sendo incolor para presença das três lipoxigenases, amarela para ausência da isoenzima Lox 3, azul para ausência das enzimas Lox 1 e Lox 2 e verde para ausência das isoenzimas.

Para detecção de lipoxigenases não houve necessidade de analisar a isoenzima Lox 2, uma vez que o locus L1 encontra-se ligado ao locus L2. O método utilizado foi não destrutivo e todas as sementes analisadas foram semeadas para obtenção da população F₂.

Foram geradas duas matrizes binárias com a fenotipagem para ausência das isoenzimas de lipoxigenase. Uma para ausência de Lox 1 e Lox 2 e outra para ausência de

Lox 3. Essas matrizes foram utilizadas para análise de segregação, construção do mapa genético e para a seleção baseada no método colorimétrico.

Extração de DNA

Após o teste colorimétrico, as sementes F₂ foram semeadas em casa de vegetação e as plantas utilizadas como fonte de material para extração de DNA.

As duas primeiras folhas trifoliadas de cada uma das 155 plantas F₂ derivadas do cruzamento BRS 213 x BR 36 foram coletadas. Imediatamente após a coleta, as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a – 80° C.

O processo de extração de DNA foi realizado com base no procedimento descrito por Keim et al. (1988) com algumas modificações.

A quantificação de DNA foi realizada em espectrofotômetro GeneQuant II RNA/DNA Calculator - Pharmacia Biotech (SAMBROOK et al., 1989) e a verificação da integridade das amostras de DNA, por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Os géis foram fotodocumentados através do sistema digital Kodak DC 290.

Amplificação de microssatélites e visualização dos fragmentos

Foram selecionados 45 marcadores moleculares microssatélites (Tabela 1), baseando-se em trabalhos realizados por Kim M.Y. et al. (2004), Kim Y.S. et al. (2006) e Reinprecht et al. (2006). Esses marcadores encontram-se localizados nas regiões onde, segundo esses autores, estão os genes das isoenzimas de lipoxigenase. Os marcadores do microssatélites usados foram desenvolvidos e publicados por Cregan et al. (1999) e suas posições e seqüências estão disponível em <http://soybase.agron.iastate.edu/>.

Os marcadores que apresentaram polimorfismo foram utilizados para investigar a existência de ligação gênica. Inicialmente foram utilizados 10 indivíduos da população com ausência e 10 com presença das isoenzimas de lipoxigenase para a verificação de uma possível ligação entre o marcador e o gene de interesse. Os marcadores que apresentaram essa possível ligação foram utilizados para a caracterizar a população. As amplificações foram realizadas no termociclador Perkin-Elmer Gene Amp 9700 (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT). As reações foram preparadas em volume final de 10 µL contendo 30 ng de DNA molde, 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 1,3 mM de desoxinucleosideotrifosfato – dNTP's, 1 U de Taq-DNA polimerase e 2 µM de cada iniciador *Forward* e *Reverse*.

O programa de termociclagem foi composto de um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos seguidos de 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 55°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos e de um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% por aproximadamente 4 horas. Foi utilizado marcador de 100 pares de base (pb) para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados. Os fragmentos foram corados com brometo de etídio (0.2 g/mL) e fotodocumentados para análise das bandas de DNA.

A genotipagem foi realizada através da criação de uma matriz binária que foi utilizada na análise estatística e na construção do mapa genético.

Tabela 1 – Marcadores SSR utilizados para a amplificação de DNA.

Marcador	G.L.	Iniciador	Seqüência
Satt072	F	Forward	GGAAAGAATCAGCAAAAT
		Reverse	CCCCACATAAATAATAAA
Satt490	F	Forward	GCGGCACGAGTCAACTTTCTGTTTCCT
		Reverse	GCGGAAGAAGATTTTCGTTTTTAT
Satt144	F	Forward	CGTCGCCATCACTATGAGAA
		Reverse	CCATCTTGAGCAGAGTTTGAAGTT
Satt554	F	Forward	GCGATATGCTTTGTAAGAAAATTA
		Reverse	GCGCAAGCCCAAATATTACAAATT
Satt218	F	Forward	TCAATCAACAAAAACATAATTCTTC
		Reverse	ATTTGTGTTTTGTTTTAGCTCTCTA
Satt522	F	Forward	GCGAAACTGCCTAGGTTAAAA
		Reverse	TTAGGCGAAATCAACAAT
Sat_090	F	Forward	CTCGCTGCTACTGGTC
		Reverse	AAGAATGCGTTGGATTTA
Satt656	F	Forward	GCGTACTAAAAATGGCAATTATTTGTTG
		Reverse	GCGTGTTTCAGTATTTGGATAATAGAAT
Sat_417	F	Forward	GCGAATATGGCGTTGAAAATAGTGAT
		Reverse	GCGACCCAGATTCTGTGCTAAGA
Sat_074	F	Forward	GGGTGAGAAATACATGCAACTTACA
		Reverse	GGGCATCAAAATTGATATTAATGTCTAA
Satt395	F	Forward	CGCGCTAGTTGAATGAATGT
		Reverse	GCGCATTGAGGAATTTTTTAT
Satt404	M	Forward	TCATCCGCCATTGATTTT
		Reverse	GCCCGGAACATACAAAAT
Satt590	M	Forward	GCGCGCATTTTTTAAGTTAATGTTCT
		Reverse	GCGCGAGTTAGCGAATTATTTGTC
Satt201	M	Forward	GCGTTGATACTTTCCTAAGACAAT
		Reverse	GGGAGAGAAGGCAATCTAA
Satt150	M	Forward	AAGCTTGAGGTTATTCGAAAATGAC
		Reverse	TGCCATCAGGTTGTGTAAGTGT
Satt567	M	Forward	GGCTAACCCGCTCTATGT
		Reverse	GGGCCATGCACCTGCTACT
Satt540	M	Forward	CTGGCGAATCAAGCTTTGTAAC
		Reverse	CCGTGATTGCGAAGAGGATATT

Lipoxigenase 1 e 2

Lipoxigenase 3

Continua...

Satt435	M	Forward	GCGGTGAAACGGCTCTCTTTGATAGTA	Lipoxigenase 3	
		Reverse	GCGTTGGATTAATTAATTAATTAATTTT		
Satt463	M	Forward	TTGGATCTCATATTCAAACCTTCAAG		
		Reverse	CTGCAAATTTGATGCACATGTGTCTA		
Satt245	M	Forward	AACGGGAGTAGGACATTTTATT		
		Reverse	GCGCCTCCTGAATTTCAAAGAATGAAGA		
Satt220	M	Forward	GAGGAGGATCCCAAGGTAATAAT	Lipoxigenase 3	
		Reverse	GCGCATGGAGAAAAGAAGAG		
Satt536	M	Forward	GCGCCACAGAAATTCCTTTTTTCTA		
		Reverse	GCGCCATAAGGTGGTTACCAAAGA		
Satt575	E	Forward	GCGGCTAATTTTGTATTATAGGAAT		Lipoxigenase 3
		Reverse	CCGCTACCATCTCGGAGGACT		
Satt213	E	Forward	CCGCTTATTTCTGTCTATC		
		Reverse	AGCCAAAACCCACAA		
Sat_112	E	Forward	TGTGACAGTATACCGACATAATA		
		Reverse	CTACAAATAACATGAAATATAAGAAATA		
Satt411	E	Forward	TGGCCATGTCAAACCATAACAACA	Lipoxigenase 3	
		Reverse	GCGTTGAAGCCGCCTACAAATATAAT		
Sat_124	E	Forward	GGGTCCATTCCACTTTTTGTACAATAT		
		Reverse	GGGAGTTCAAACATCCATTAGTGGTATA		
Satt384	E	Forward	TGGGGGTCAATTTTAATTTGTGC		
		Reverse	ATTTCCCTTTCACCCACCTCTGTTT		
Satt212	E	Forward	CCAATCCAAACAAATCCACT	Lipoxigenase 3	
		Reverse	CAGCAATGATGATAATGAATGA		
Satt598	E	Forward	CGATTTGAATATACTTACCGTCTATA		
		Reverse	CACAATACCTGTGGCTGTTATACTAT		
Satt573	E	Forward	GCGGATTTGATTTGAATATACTTAC		
		Reverse	CCTGTGGCTGTTATACTATGCATATA		
Satt602	E	Forward	GCGGCGTTAGTGAATAGAACTA	Lipoxigenase 3	
		Reverse	GCGGGTATACCAAATGAGATAAT		
Satt204	E	Forward	GCCATCTTGTTACAATGCAGGTA		
		Reverse	CCTTACTCACTCCATTGGCATAATA		
Satt491	E	Forward	CCTAAATTGATGAAAGGATACAAG		
		Reverse	GCCCCACAAATATTCAGAAGGTAA		
Satt268	E	Forward	TCAGGGGTGGACCTATATAAAATA	Lipoxigenase 3	
		Reverse	CAGTGGTGGCAGATGTAGAA		
Satt185	E	Forward	GCGCATATGAATAGGTAAGTTGCACTAA		
		Reverse	GCGTTTTCTACAATAATATTTTCTAT		
Satt151	E	Forward	ATTGCCTAATTTCTGTTTGTGTAA		
		Reverse	CCAAAATTCAAGGCAGTGAC		
Satt403	E	Forward	GCGGGTTTTATTTTATTATAAATT	Lipoxigenase 3	
		Reverse	GCGGATGCCTGGGAGAATATTTCC		
Satt483	E	Forward	GCGGACACGAAATTTTAATTATT		
		Reverse	GTCTCAACTCTCCGACACCTACTT		
Satt452	E	Forward	GCGGTCGCTGCGTTCAATAT		
		Reverse	GCGCCCAATTATCATGGTAGA		
Satt355	E	Forward	GCGTCCAGGACATCATCATCATC	Lipoxigenase 3	
		Reverse	GCGTAGCGTGTTATTTTGTGTTTG		
Satt263	E	Forward	CACCCAATCATGATAGCATTTTAT		
		Reverse	CTCATGGAATTGTCTTTCAGTTTC		

Continua...

Satt117	E	Forward	AAAAATTGTATTTGTAAGAGAGAG	Lipoxigenase 3
		Reverse	AATTGCATCTTGTACTTAACTG	
Satt045	E	Forward	TGGTTTCTACTTTCTATAATTATTT	
		Reverse	ATGCCTCTCCCTCCT	
Satt369	E	Forward	AACATCCAAAGAAATGTGTTTCAAA	
		Reverse	GCGAGTTCGAATTTCTTTTCAAGT	
Satt553	E	Forward	GCGCCTTCTGTTCCATCACAGAT	
		Reverse	GCGGCTTGTGAAACTGGCTGATTAT	
Satt231	E	Forward	GCGTGTGCAAAATGTTTCATCATCT	
		Reverse	GGCACGAATCAACATCAAAACTTC	
Satt230	E	Forward	CCGTCACCGTTAATAAAATAGCAT	
		Reverse	CTCCCCAAATTTAACCTTAAAGA	

G.L. – Grupo de Ligação

Análise estatística

Os resultados da análise química para ausência de lipoxigenase em sementes foram submetidos ao teste qui-quadrado para verificar a segregação. O programa computacional GQMOL (Genética quantitativo e molecular), versão 2006.9.1 (CRUZ; SCHUSTER, 2006), foi utilizado para realizar as análises de segregação e os cálculos da frequência de recombinação, da distância genética entre os diferentes marcadores genéticos e da determinação do posicionamento dos marcadores. O agrupamento dos marcadores foi realizado utilizando valor limite de detecção (LOD) de 3,0 e, a conversão da frequência de recombinação para centimorgans (cM) utilizou a distância de mapeamento de Kosambi. Foram construídos os mapas genéticos com todos marcadores que estão ligados aos genes em estudo.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação fenotípica da população F_2 realizada através método colorimétrico, embora não permitiu a visualização dos indivíduos heterozigotos, indicou segregação para presença e ausência das isoenzimas lipoxigenases (Figura 1).

Para a análise da segregação de F_2 foram considerados apenas dois genes, devido a forte ligação entre o locus L1 e L2. Os resultados foram confirmados pelos valores do teste de Qui-quadrado, onde a segregação não foi estatisticamente significativa, ocorrendo de acordo com a segregação esperada, isto é, na disposição de 9:3:3:1 (9 – presença de L1, L2 e L3; 3 – ausência de L1 e L2; 3 – ausência de L3; e 1 – ausência de L1, L2 e L3) (Tabela 2). A segregação ocorreu também de forma esperada quando considerado os genes

separadamente, isto é, na disposição de 3:1 (3 – presença de L1, L2 e L3; 1 – ausência de L1 e L2 ou L3) (Tabela 2).

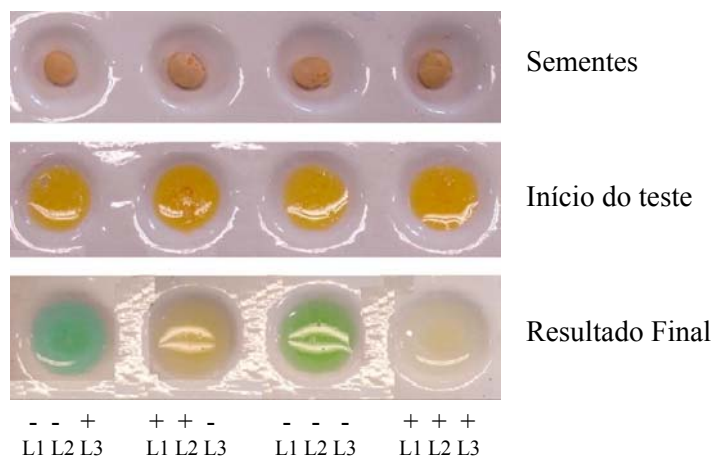


Figura 1 – Detecção visual para presença de lipoxigenase em sementes de soja derivado do cruzamento entre mutante triplo com ausência de todas isoenzimas e uma variedade com a presença de lipoxigenase.

Tabela 2 – Teste de Qui-quadrado para a fenotipagem da geração F₂ do cruzamento BR 36 e BRS 213.

Marcador	N ^a	Observado ^b			Esperado ^b	Qui-quadrado ^c	Probabilidade (%)
		A	B/C	D	A:B:C:D		
Lox 1, 2 e 3	168	98	34/21	15	9:3:3:1	5,757 ns	12,4071
Lox 1 e 2	168	119	34	15	3:1	1,556 ns	21,2317
Lox 3	168	132	21	15	3:1	1,143 ns	28,5049

^a Número total de sementes avaliadas;

^b Segregação: A – Presença de lipoxigenase; B – Ausência de Lox 1 e 2; C – Ausência de Lox 3; D – Ausência de Lox 1, 2 e 3;

^c ns – não significativo a 1% para o teste de Qui-quadrado.

A escolha do tipo de população mais apropriada ao mapeamento está relacionada com o tipo de marcador empregado (TANKSLEY et al., 1988). O máximo de informação genética é alcançado quando se usa uma população F₂ e marcadores codominantes (STAUB et al., 1996). Justificando assim a escolha da população F₂ do cruzamento BR 36 x BRS 213 e a utilização de marcadores microsatélites para o estudo.

Embora um dos critérios usados para a seleção das linhagens genitoras tenha sido a maximização da distância genética entre as variedades, o polimorfismo de DNA entre as duas linhagens genitoras foi considerado baixo do ponto de vista do experimento, pois não

apresentou muitos marcadores polimórficos nos grupos de ligação onde estão os genes de interesse.

Os marcadores testados para Lox 1 e 2 apresentaram polimorfismo para os parentais, mas quando testados na população não apresentaram polimorfismo. Foram testados todos os marcadores próximos à região onde estariam os genes segundo Kim M.Y. et al. (2004), Kim Y.S. et al. (2006) e Reinprecht et al. (2006). Segundo esse autores o L1 e L2 está localizado entre os marcadores Sat_090 e Sat_074 no grupo de ligação F do mapa de ligação da soja de Cregan et al. (1999).

Para Lox 3 foram encontrados oito marcadores polimórficos. Devido à divergência entre Kim et al. (2006) e Reinprecht et al. (2006) sobre a localização deste gene foram testados marcadores para os dois grupo de ligação. Segundo Kim et al. (2006) o locus L3 estaria no grupo de ligação M (CREGAN et al., 1999) próximo ao marcador Satt150 e Reinprecht et al. (2006) localizou o gene no grupo de ligação E próximo ao marcador Satt212. Apenas o grupo de ligação E apresentou marcador ligado ao gene de interesse. Dessa forma, podemos dizer que o locus que controla a produção da isoenzima Lox 3 está localizado no grupo de ligação E. A Figura 2 representa um exemplo da segregação dos fragmentos de DNA para o marcador Satt 212 (SSR) em parentais e na população segregante.

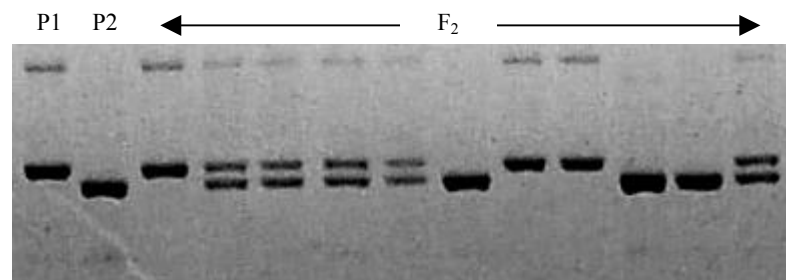


Figura 2 - Padrões de segregação de fragmentos de DNA para o *primer* SSR Satt 212 nos parentais e na população F₂. P1 é a BR 36 (Presença de Lox 3) e P2 é a BRS 213 (Ausência de Lox 3).

Utilizou-se o programa computacional GQMOL para construir um mapa genético de ligação baseado nos dados genotípicos da F₂ para os marcadores microssatélites polimórficos. A Tabela 3 mostra o resultado da genotipagem com marcadores moleculares microssatélites de 155 indivíduos da população F₂ que foram considerados para análise. Nota-se que não houve significância estatística para os marcadores testados, o que vale dizer que esses marcadores estão ligados ao gene.

Tabela 3 – Resultados da análise de segregação e qui-quadrado para o teste colorimétrico (fenotipagem) e marcadores moleculares microssatélites do cruzamento BR 36 e BRS 213.

Marcador	N ^a	Observado ^b			Esperado ^b	Qui-quadrado ^c	Probabilidade (%)
		A	B	C	A/B:C		
Lox 3	155	119	36		3:1	0,26 ns	60,9972
Satt 212	155	27	79	43	1:2:1	3,98 ns	13,6705

^a Número total de sementes avaliadas;

^b Segregação: A – Homozigoto presença de Lox 3; B – Heterozigoto; C – Homozigoto ausência de Lox 3;

^c ns – não significativo a 1% para o teste de Qui-quadrado.

A figura 3 constitui o mapa de ligação obtido para o locus L3 definido a partir da população F₂. Pode-se observar que o marcador Satt 212 está a uma distância de 24,1 cM da Lox 3. Essa distância está de acordo com a distância encontrado por Reinprecht et al. (2006).

Os marcadores identificados neste estudo encontram-se a distâncias ainda altas para serem utilizados em programas de seleção assistida. Portanto, há a necessidade de saturação destas regiões com outros marcadores. Com o mapeamento de todos esses genes, a introdução conjunta dos mesmos em variedades comerciais será grandemente facilitada pelo uso da seleção assistida por marcadores moleculares.

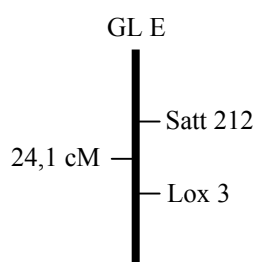


Figura 3 – Mapa molecular E de ligação (Cregan et al., 1999) do Lox 3 foi definido usando a população F₂ (BRS 213 x BR 36). Os nomes dos marcadores estão à direita e as distâncias do mapa de Kosambi estão à esquerda.

Todos os outros marcadores polimórficos para Lox 3 nos parentais desse grupo de ligação não apresentaram polimorfismo quando testados na população F₂. Dessa forma, não foi possível o flanqueamento da região onde o gene está localizado.

São necessários novos estudos para buscar outros marcadores moleculares mais específicos e mais eficientes que poderão ser utilizados na seleção assistida para ausência de lipoxigenase em sementes de soja.

No futuro, os marcadores SNP's poderão ser utilizados para a saturação do mapa de ligação desses genes, pois já existem estudos que identificaram SNP's relacionados a lipoxigenase. Entretanto, eles ainda apresentam custo elevado, o que inviabiliza sua utilização na seleção assistida para essas características, uma vez que existem outras técnicas eficientes e mais acessíveis.

3.5 Conclusões

A ausência de lipoxigenase é dividida a ação de três genes recessivos (L1, L2 e L3). Na população esses genes são provenientes da cultivar BRS 213.

Não houve distorção de segregação significativa para nenhum dos locos de microssatélites analisados de acordo com o teste do χ^2 . O Satt 212, grupo de ligação E, apresentou-se ligado ao Lox 3 a uma de 24,1 cM.

A população F2 não apresentou polimorfismo para marcadores microssatélites do grupo de ligação F, não sendo possível a realização do mapeamento dos locos L1 e L2 para ausência de lipoxigenase.

PARTE 2

Artigo B

Análise da expressão da Glicosiltransferase implicadas na síntese de precursores de aromas de tomate por PCR quantitativa.

Analise de la expression de glycosyltransférases impliquées dans la synthèse de précurseurs d'arômes de tomates par PCR quantitative.

Analysis of expression of glycosyltransferases implied in the synthesis of precursors of aromas in tomatos.

Estudo realizado sobre a direção de Christian CHERVIN,
Dentro da equipe «Aromas » dirigida pelo professor Jean-Claude PECH
Janeiro-Março 2008



4 Análise da expressão de glicosiltransferases implicadas na síntese de precursores de aromas em tomates por PCR quantitativo.

Resumo

Em muitas frutas, incluindo as frutas de tomates, uma grande parte dos compostos voláteis com um potencial aromático é armazenada sob forma glicosilada (não-voláteis). As enzimas que realizam essas sínteses não foram ainda identificadas, mas pertencem provavelmente à família das glicosiltransferases (GT) e mais precisamente a família das GT1. Utilizou-se um modelo de consenso de GT1 de plantas e de uma seqüência GT de morango (implicado na glicosilação do ácido cinâmico) dentro de um banco EST, para identificar a seqüência de GT de tomates. Em seguida, verificou-se a expressão de uma centena de candidatos durante o desenvolvimento do fruto em um banco de resultados de microarranjos. Após essa primeira triagem, seis candidatos cuja expressão parecia específica ao fruto de tomate foram selecionados e a sua especificidade de expressão nos frutos foi confirmada por PCR quantitativa. Foi utilizada para o estudo a variedade de tomate MicroTom (*Solanum lycopersicon*) para o estudo. Estas plantas foram semeadas *in vitro* sobre um meio MS/2 (Duchefa) e cultivadas phytotron A expressão desses seis candidatos foi maior na maturação dos frutos (B e B+3). As glicosiltransferases provavelmente estão envolvida na cadeia de produção de aromas em tomates.

Résumé

Dans de nombreux fruits, et parmi eux les fruits de tomates, une grande partie des composés volatils ayant un potentiel aromatique est stockée sous forme glycosylée (non-volatile). Les enzymes qui réalisent ces synthèses n'ont pas été identifiées, mais appartiennent vraisemblablement à la famille des glycosyltransférases (GT) et plus précisément à la famille des GT1. Nous nous sommes servi d'un motif consensus de GT1 de plantes et d'une séquence de GT de fraise (impliquée dans la glycosylation de l'acide cinnamique) pour identifier des séquences de glycosyltransférases de tomates, dans les banques d'EST. Puis l'expression d'une centaine de candidats au cours du développement du fruit a été vérifiée sur une banque de résultats de microarrays. Après ce premier triage, six candidats dont l'expression semblait spécifique au fruit ont été sélectionnés et leur spécificité d'expression dans les fruits a été confirmée par PCR quantitative. L'expression de celui-ci six candidats a été plus grande dans la maturation des fruits (B et B+3). Les glicosiltransferases probablement sont engagées dans la chaîne de production d'aromes dans des tomates.

Abstract

In many fruits, including tomato fruits, most of the volatile compounds with an aromatic potential are stored in a glycosylated form (non-volatile). The enzymes responsible for these syntheses have not been identified yet, but they probably belong to the glycosyltransferases' (GT) family and more precisely to the GT1 family. To identify tomato glycosyltransferases sequences in EST databases, a consensus pattern of GT1 plant and a GT sequence of strawberry (implied in the glycosylation of the cinnamic acid) were used. The expression of a hundred of candidates genes was checked on a database of microarrays results over the fruit development time frame. Six candidates genes expression seemed to be specific to the tomato fruit were selected and their specificity of expression in the fruits was confirmed by quantitative real-time PCR. The expression of these six candidates was bigger in the maturation of the fruits (B and B+3). Glycosyltransferases probably is involved in the chain of production of aromas in tomatoes.

4.2 Introdução

O tomate (*solanum lycopersicon*) pertence à família das solanáceas (batata, berinjela, pimenta, entre outras) e constitui um alvo agrônômico importante. O seu fruto, habitualmente classificado entre os legumes, é consumido em todas as nas regiões do mundo. Trata-se de resto do legume mais cultivado ao mundo após a batata, a mandioca e patate suave, mas o primeiro em termos de alimento que não possui fécula (FAO). O melhoramento do tomate por muito tempo tem-se adaptado às necessidades dos produtores (variedades produtivas, aptas à produção em estufa de inverno e resistentes às doenças) bem como aos dos distribuidores (frutos firmes, tendo uma boa duração de conservação e de aparência atrativa). A fim de responder aos desejos dos consumidores (BALDWIN et al., 2000), o melhoramento da qualidade organoléptica do fruto (açúcares, acidez, textura, cor, aromas) tornou-se um novo desafio para os melhoristas. A qualidade dos frutos é um caráter fortemente influenciado pelas condições ambientais ao longo de todo o seu desenvolvimento, desde a fecundação até a colheita. A fase de desenvolvimento do fruto é um fenômeno geneticamente programado que corresponde à expressão de genes responsáveis pelas mudanças bioquímicas, fisiológicas e estruturais que tornam os frutos comestíveis e atrativos. Uma das fases mais espetaculares do desenvolvimento do tomate intervêm durante o amadurecimento (ALBA et al., 2005) onde, na seqüência de uma produção maciça de etileno, o metabolismo dos frutos altera profundamente (crise climatérica), o que se traduz nomeadamente numa mudança de cor e um nítido aumento da atração do fruto.

Entre os componentes da qualidade sensorial de um fruto, os aromas desempenham um papel preponderante e participam, com os teores em açúcares e ácidos que proporcionam geralmente o sabor (BALDWIN et al., 2000). Esses aromas, num fruto de tomate, são constituídos por uma cadeia de compostos voláteis e não voláteis (BALDWIN et al., 2000). Além disso, estes metabólicos secundários são derivados de uma gama de precursores que compreendem carotenóides, lipídeos e aminoácidos. Muitas enzimas e genes que constituem estas vias metabólicas foram caracterizadas recentemente (PECH et al., 2000).

Entre os quinze compostos mais importantes para o aroma de tomate, oito foram identificados sob forma glicosilada no fruto de tomate (BALDWIN et al., 2000; BUTTERY et al., 1990; MARLATT et al., 1992). Alguns pesquisadores (Takeoka et Günata) acreditam que mais da metade dos compostos voláteis são armazenados primeiro sob formas de glicosídeos. Entre estes compostos glicosilados, encontram-se os 2-feniletanol, o álcool benzílico, o 3-metilbutanol e o β - damascenone.

Como estes glicosídeos podem liberar a forma aglicona após hidrólise química ou enzimática durante amadurecimento, a alteração física (ruptura dos tecidos durante a mastigação) ou a transformação (cozedura) dos frutos, parece evidente que estes heterosídeos participam de maneira significativa na qualidade organoléptica dos frutos.

A formação dos glicosídeos é catalisada por uma família ubiquitária de enzimas chamada glicosiltransferase (GT). Essas enzimas transferem geralmente o resíduo glucose de uma UDP glucose sobre uma associação aglicona (MOCK et al., 1993). As glicosilações ocorrem normalmente dentro do citosol, mas os compostos conjugados freqüentemente são armazenados em vacúolo (VOGT et al., 2000). Todas as GT conhecidas são classificadas em quase 90 famílias (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>). A família que contém mais seqüências de GT é a família 1 (GT1) (GACHON et al., 2005). Esta família é conhecida por glicosilar numerosos compostos como os flavonóides, os alcalóides, os terpenóides, as antocianinas, e certos hormônios de plantas. Um modelo consensual de GT de plantas foi destacado. Esse modelo consensual, chamado PSPG box (*Plant Secondary Product Glycosyltransferase* – Produtos secundários de glicosiltransferase em plantas), está presente na família GT1. O modelo PSPG, típico das glicosiltransferases do metabolismo secundário das plantas, é considerado como representante do sítio de ligação do UDP-glucose. Consiste num curto fragmento de 44 aminoácidos próximo da parte C-terminal da proteína e contém o modelo consensual das glicosiltransferases da família GT1 (GACHON et al., 2005).

Antigos estudos de bioquímica mostraram um aumento das atividades GT durante a fase de amadurecimento do fruto (FLEURIET et al., 1985). Uma glicosiltransferase

de morango foi identificada e caracterizada (LUNKENBEIN et al., 2006). Essa glicosiltransferase é uma Udp-glicose: cinamato glucosiltransferase (FaGT2). Transcritos o FaGT2 é expresso fortemente nos frutos em maturação. A proteína que recombina é capaz de glicosilar o ácido benzóico, o ácido cinâmico e os seus derivados respectivos.

A partir do trabalho desenvolvido por Leitão (2007) o objetivo do estudo foi analisar a expressão das glicosiltransferases que podem desempenhar um papel na síntese de precursores de aromas no fruto de tomate e comparar com os resultados.

4.3 Material e Métodos

Material Vegetal

Foi utilizada a variedade de tomate MicroTom (*Solanum lycopersicon*) para o estudo. Estas plantas foram semeadas *in vitro* sobre um meio MS/2 (Duchefa) e cultivadas phytotron (16h/8h; 25°C/20°C; 70% HR). Para o estudo do desenvolvimento dos frutos, foram utilizados as seguintes fases: EIMG (*Early Immature Green* – Verde imaturo adiantado), IMG (*Imaturo Green* – Verde imaturo), MG (*Mature Green* – Verde maduro), B (*Breaker* – Mudando de verde para vermelho), B+2 (*Breaker* + 2 dias), B+3 (*Breaker* + 3 dias), B+7 (*Breaker* + 7 dias), B+14 (*Breaker* + 14 dias). EIMG, IMG e MG correspondem a fases onde o fruto é verde. A diferença entre essas fases reside no fato de que um fruto na fase MG adquiriu a capacidade de amadurecer em resposta ao etileno. Também foram avaliados flores, folhas, caules e raízes. Os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido logo após sua coleta e armazenados à -80°C.

Extração dos RNA totais de frutos de tomates e síntese de cDNA

A extração dos RNA totais dos frutos foi realizada de acordo com o protocolo CTAB. O CTAB é um detergente que permite destruir as células e separar os ácidos nucléicos das proteínas e polissacarídeos.

Dez microgramas de RNA totais de fruto são utilizados como matriz para a reação de transcrição reversa a fim de produzir cDNA. A reação de transcrição reversa é feita com a enzima *Omniscript reverse transcriptase*, de acordo com o protocolo do fabricante.

PCR quantitativa

Os RNA extraídos a partir dos tomates MicroTom correspondem às fases EIMG, IMG, MG, B, B+3, B+7, B+14, folha, flor, caule e raiz. Os RNA tratados com DNase (2µg) foram retrotranscritos num volume final de 20µl.

A PCR quantitativa foi realizado utilizando o cDNA que corresponde à 2,5ng de RNA totais em 10µl de volume de reação com Master Mix SYBR GREEN PCR (Pe-Applied Biosystems) num sistema de detecção de seqüência ABI PRISM 7900HT. O *software* PRIMER EXPRESS (Pe-Applied Biosystems) foi utilizado para desenhar os começos específicos dos genes (Iniciadores), SIGT1 (F): 5' -CGCAGAGATGAAAGAAAACGC-3' e SIGT1 (R): ' 5' -ATTCTGCTGGGATGAGCCAC-3 ', SIGT2 (F): ' 5' -TCGCCCACCGTCGTATG-3' e SIGT2 (R): ' 5' -CATCAGAGAATGCCGCCAA-3 ', SIGT3 (F): ' 5' -CGCAAGCGGAAGTT-TTGAAG-3 ' e SIGT3 (R): ' 5' -GGGAACTCCAGAAGCTATGCTTT-3 ', SIGT4 (F): ' 5' -AAAGGGCTTGCAGATATGGC-3' e SIGT4 (R): ' 5' -CCAATTTTTGGTTGTTGTGTGA-3 ', SIGT5 (F): ' 5' -GGAGCCATTGGCGCTCTAC-3' e SIGT5 (R): ' 5' -GTCAACCTTAC-TACCCGAATCCA-3' e SIGT6 (F): ' 5' -TGGCTCTGTCTCTGGCTTTCA-3' e SIGT6 (R): ' 5' -CGTCCTCTTTCTCCTACCATTTTC-3'.

A Actina foi utilizada como gene de referência, pois tem expressão constante em diversos tecidos (El-SHARKAWY et al., 2005). Para todos os genes estudados, a concentração ótima dos iniciadores foi 300 nM, exceto para SIGT6, 900 nM.

As condições de RT-PCR foram: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, seguidamente 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos e de 60°C durante 1 minuto e por último um ciclo a 95°C durante 15 segundos e de 60°C durante 15 segundos. Cada reação é realizada em 3 repetições técnicas sobre uma placa de 384 poços.

Para cada amostra, um valor Ct (threshold constant) foi calculado a partir das curvas de amplificação selecionando o ΔRn ótimo (emissão da fluorescência) na parte exponencial da curva de amplificação. Diferenças relativas são calculadas baseando-se no método comparativo de Ct utilizando o gene da actina (Número de acesso Q96483 - GenBank) como padrão. Para determinar as diferenças relativas de cada amostra, o valor Ct dos genes GT é normalizado com o valor Ct de Sl-Actin-51 e calculado utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.4 Resultados

Uma combinação da bioinformática, da biologia molecular e da bioquímica, permitiu a identificação de glicosiltransferases potenciais envolvidos na síntese de precursores de aromas em frutos de tomate.

A identificação e seleção dos genes foram realizadas por Leitão (2007). Esses genes foram utilizados para fazer a caracterização da expressão durante a maturação dos frutos em duas repetições biológicas.

Através da seqüência de FaGT2 foram encontradas 109 seqüências relacionadas no banco BLAST, mas apenas 37 estavam relacionados GT. Dentre essas foram selecionados seis seqüências de genes potencialmente expressos dentro de frutos apresentados no banco TED (*Tomato Expression Database* – Base de dados de expressão de tomates - <http://ted.bti.cornell.edu/>). Os genes candidatos foram nomeados SIGT1 a 6 (*Solanum lycopersicon* glicosiltransferase 1 a 6).

Analisando-se as repetições biológicas 1 e 2 podemos observar que para exceto para SIGT1 e 4, onde há uma pequena divergência entre as duas repetições, a curva de expressão dos genes de glicosiltransferase se equivalem (Figura 1 e 2).

Analisando os perfis de expressão dos seis genes, SIGT1 a 6, podemos observar que são mais expressos nos frutos em maturação que os tecidos de raízes, caules, folhas ou frutos verdes chegando a ser cinco vezes mais expresso (Figura 1 e 2). Esses resultados estão de acordo com as análises gerais de atividade GT feitas por Fleuriet e Macheix (1985), segundo esses autores, a atividade GT é maior no pericarpo. Embora a extração dos RNAs não ter sido realizada em diferentes tecidos do fruto, sugere-se a realização de estudos para verificar a expressão dos genes de GT no pericarpo e na polpa.

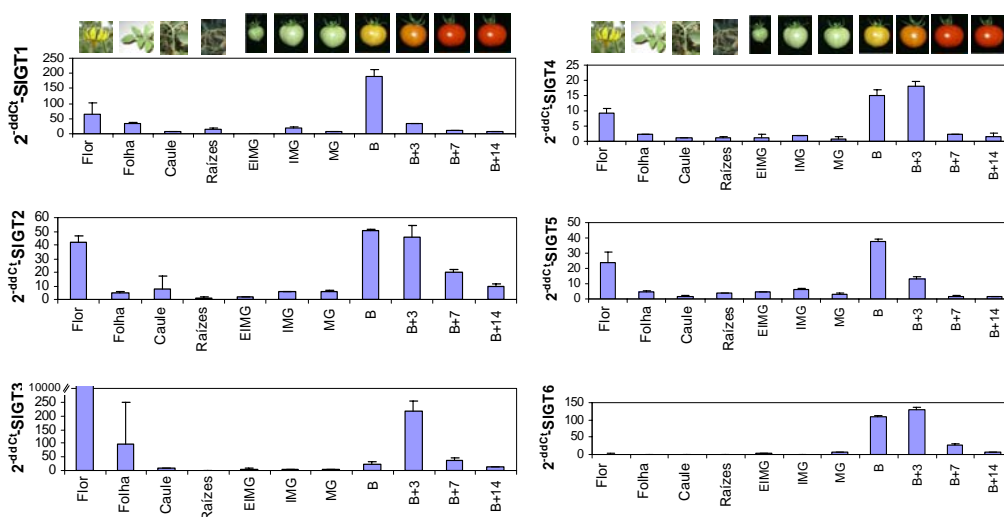


Figura 1 – Expressão dos seis genes de glicosiltransferase durante a maturação e em alguns tecidos da planta (Repetição Biológica 1).

EIMG – Verde imaturo adiantado, IMG – Verde imaturo, MG – Verde maduro, B – Breaker (Mudando de verde para vermelho), B+3 – Breaker mais 3 dias, B+7 – Breaker mais 7 dias e B+14 – Breaker mais 14 dias.

A quantidade de RNAm dos genes GT aumenta durante as etapas B e B+3, que correspondem à mudança de cor e a iniciação da fase de amadurecimento do fruto. A expressão dos genes GT também é observada nas flores, principalmente em SIGT3 (GT 3), e nas folhas, mas normalmente com um nível menor que nos frutos. Para GT 3 o valor da expressão nas flores chega a ser 10 mil vezes maior que nos outros tecidos, que sugere essa GT esta envolvida com o aroma das flores (Figura 1 e 2).

O RNAm da GT detectado nos caules, raízes e nos frutos verdes (EIMG, IMG e MG) tem menor expressão quando comparado aos frutos maduros (Figura 1). O predomínio dos RNA da GT nos frutos está de acordo com os resultados obtidos na base de dados TED (FEI et al., 2006) e por conseguinte validando a escolha inicial dos gene candidatos feita por Leitão (2007).

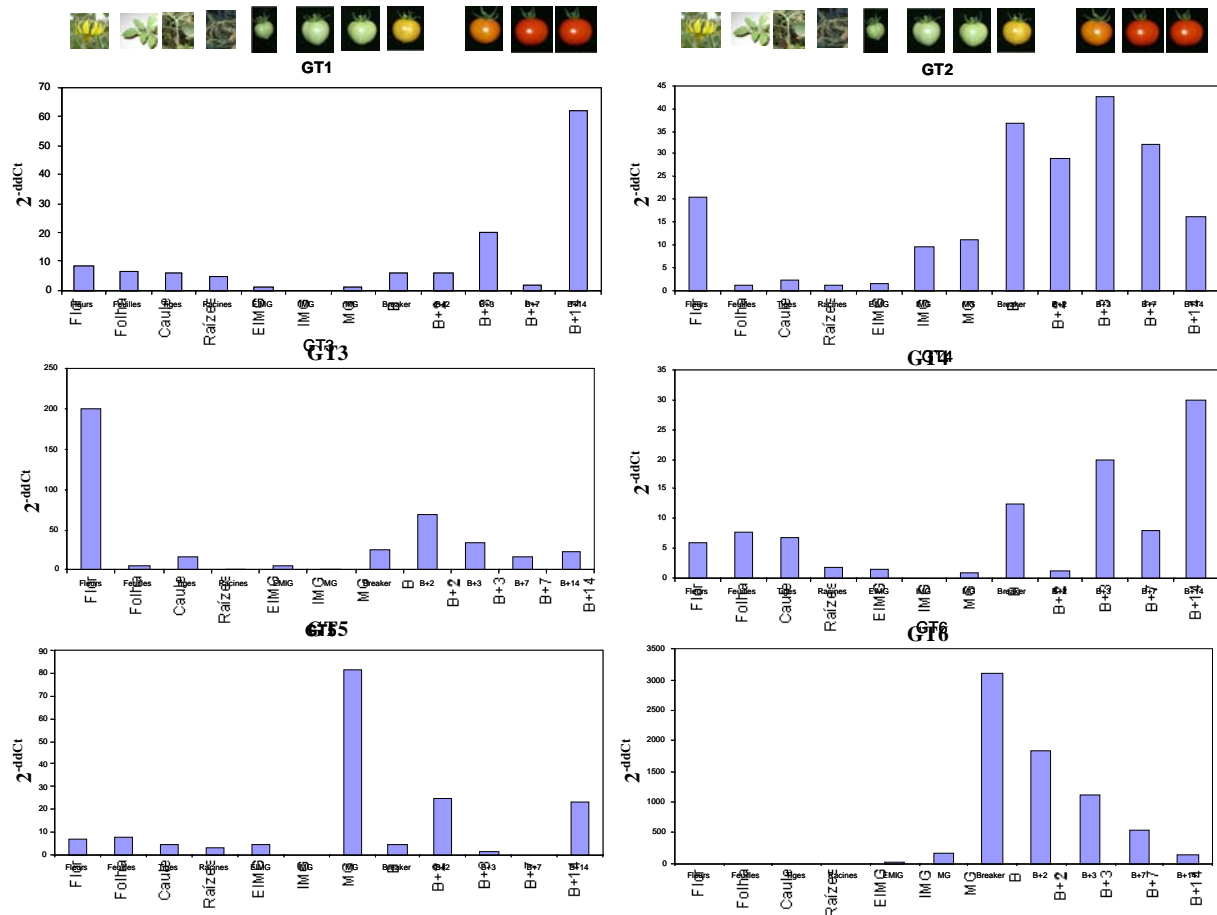


Figura 2 – Expressão dos seis genes de glicosiltransferase durante a maturação e em alguns tecidos da planta (Repetição Biológica 2).

EIMG – Verde imaturo adiantado, IMG – Verde imaturo, MG – Verde maduro, B – Breaker (Mudando de verde para vermelho), B+3 – Breaker mais 3 dias, B+7 – Breaker mais 7 dias e B+14 – Breaker mais 14 dias.

4.5 Conclusões

Os genes de glicosiltransferase (S1GT1 a 6) analisados, embora em valores diferentes, foram expressos em todos os tecidos avaliados (flor, caule, raiz e fruto).

A maior expressão das glicosiltransferase foi observada nos frutos em maturação, principalmente em B e B+3, sugerindo o envolvimento das glicosiltransferases na cadeia de produção de aromas em tomates.

A S1GT3 teve maior expressão nas flores, sugerindo a seu envolvimento na produção de aromas de flores.

4.6 Referência

ALBA R., P. PAYTON, Z. FEI, R. MCQUINN, P. DEBBIE, G.B. MARTIN, S.T. TANKSLEY, J. GIOVANNONI, Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development, *The Plant Cell* 17, 2954-2965, 2005.

BALDWIN E.A., J.W. SCOTT, C.K. SHEWMAKER, W. SCHUCH, Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components, *Hortscience* 35, 1013-1022, 2000.

BUTTERY R.G., G. TAKEOKA, R. TERANISHI, L.C. LING, Tomato aroma components: identification of glycoside hydrolysis volatiles, *J. Agric. Food. Chem.* 38, 2050-2053, 1990.

EL-SHARKAWY I., D. MANRIQUEZ, F.B. FLORES, F. REGAD, M. BOUZAYEN, A. LATCHÉ, J.C. PECH, Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity, *Plant Mol. Biol.* 59, 345-362, 2005.

FEI Z., X. TANG, R. ALBA, J. GIOVANNONI, Tomato expression database (TED): a suite of data presentation and analysis tools, *Nucleic Acids Research* 34, 766-770, 2006.

FLEURIET A., J.J. MACHEIX, Tissue compartmentation of phenylpropanoid metabolism in tomatoes during growth and maturation, *Phytochemistry* 24, 929-932, 1985.
Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/>

GACHON C.M.M., M. LANGLOIS-MEURINNE, P. SAINDRENAN, Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis, *TRENDS in Plant Science* 10, 542-549, 2005.

LEITAO, C. Identificação de glycosyltransférases implicadas na síntese de precursores d'arômes de tomate. Dissertação de mestrado, 2007.

LIVAK K.J., T.D. SCHMITTGEN, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, *METHODS* 25, 402-408, 2001.

LUNKENBEIN S., M. BELLIDO, A. AHARONI, E.M.J. SALENTIJN, R. KALDENHOFF, H.A. COINER, J. MUNOZ-BLANCO, W. SCHWAB, Cinnamate Metabolism in Ripening Fruit. Characterization of a UDP-Glucose: Cinnamate Glucosyltransferase from Strawberry, *Plant Physiology* 140, 1047–1058, 2006.

MARLATT C., C.T. HO, M. CHIEN, Studies of aroma constituents bound as glycosides in tomato, *J. Agric. Food Chem.* 40, 249-252, 1992.

MOCK H.P., D. STRACK, Energetics of the uridine 5'-diphosphoglucose: hydroxycinnamic acid acyl-glucosyltransferase reaction, *Phytochemistry* 32, 575–579, 1993.

PECH J.C., A. LATCHÉ, B. VAN DER REST, Fruit and vegetable flavour: recent advances and futur prospects, B. Brückner, S.G. Wyllie, Woodhead Publishing, sous presse.

VOGT T., P. JONES, Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family, *Trends Plant Sci* 5, 380–386, 2000.

REFERÊNCIAS

AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A. & CREGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132:1131-1139. 1992.

AKKAYA M. S.; SHOEMAKER R.C.; SPECHT J. E.; BHAGWAY A. A.; CREGAN P. B. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. *Crop Science*: 35, 1439-1445, 1995.

ALMEIDA, L. A.; KIIHL, R. A. S.; MENOSSO, O. G.; MIRANDA, L. C.; YORINORI, J.T. Cultivar de soja BR-36. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. Anais. Londrina: Embrapa Soja, p.482, 1999.

ARUMUGANATHAN, K. e EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Repr.* 9:208-219, 1991.

AXELROD, V.; CHEESBROUGH, T.M.; LAASKO, S. Lipoxigenase from soybeans. *Methods In Enzymology*, New York, v.71, p.441-451, 1981.

CARRÃO-PANIZZI, M. C. Qualidade da produção de soja no Brasil e as perspectivas para grãos com valor agregado. In: Workshops Mercosoja: 3º Congresso de soja do Mercosul, Rosário - Argentina, 288 - 291 p., 2006.

CHUNG, J.; BABKA, H.L.; GRAEF, G.L.; STASWICK, P.E.; LEE, D.J.; CREGAN, P.B.; SHOEMAKER, R.C.; SPECHT, J.E. The seed protein, oil, and yield QTL on soybean linkage group I. *Crop Science*, v.43, p.1053-1067, 2003.

COLLINS, F.S.; BROOKS, L.D.; CHAKRAVARTI, A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome*. vol.8, p.1229-1231. 1998.

CONAB. Indicadores da agropecuária / Companhia Nacional do Abastecimento. – Ano XVII – nº 04. Brasília : Conab, 2008. Disponível em: www.conab.gov.br

CREGAN, P.B.; JARVIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, A.L.; KAYA, N.; VAN TOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, J.; SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Science*, v.39, p.1464-1490, 1999.

CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. GQMOL: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos. Versão 9.1. Viçosa: UFV, 2006.

DANESH, D.; PENUELA, S.; MUDGE, J.; DENNY, R.L.; NORDSTROM, H.; MARTINEZ, J. P. e YOUNG, N. D. A bacterial artificial chromosome library for soybean and identification of clones near a major cyst nematode resistance gene. *Theor. Appl. Genet.* 96:196-202, 1998.

Davies, C. S.; Nielsen, N. C. Registration of Soybean Germplasm that Lacks Lipoxygenase Isozymes. *Crop Sci*, 27: 370-371, 1987.

DUDLEY, J.W. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. *Crop Science*, v.33, p.660-8, 1993.

ECHT, C.S., VENDRAMIN, G.G., NELSON, C.D. AND MARQUARDT, P. Microsatellite DNA as shared genetic markers among conifer species. *Canadian Journal of Forest Research* v.29, p.365-371, 1999.

EMBRAPA SOJA. Cultivares 2005. Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária. Disponível em: www.cnpso.embrapa.br. Acesso em: 27 de maio de 2008.

FERREIRA, M. E. Caracterização da Biodiversidade e Oportunidades tecnológicas. In: **Workshop Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas, I**, Campinas, SP, Anais..., Brasília: EMBRAPA-CENARGEM. 12 p., 1996.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética. Brasília, EMBRAPA/CENARGEM, 220 p, 1995.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de Marcadores Moleculares. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM. 220 p, 1998.

GOLDBERG, R. B. DNA sequence organization in the soybean plant. *Biochem. Genet.* 16:45-68, 1978.

GURLEY, W. B., HEPBURN, A. G. e KEY, J. L. Sequence organization of the soybean genome. *Biochem. Biophys. Acta* 561:167-183, 1979.

HAJIKA M., IGITA K., KITAMURA K. A line lacking all three seed lipoxygenase isozymes in soybean induced by gamma-ray irradiation. *Jpn. J. Breeding*, 41:507-509, 1991.

HARADA, K. AND Z. XIA. Soybean genomics: Efforts to reveal the complex genome. *Breed. Sci.* 54: 215–224, 2004.

HAYWARD, M.D.; McADAM, N.J.; JONES, J.G.; EVANS, C.; EVANS, G.M.; FORSTER, J.W.; USTIN, A.; HOSSAIN, K.G.; QUADER, B.; STAMMERS, M.; WILL, J.K. Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses. *Euphytica*, v.77, p.269-75, 1994.

HILDEBRAND, D.F., AND T. HYMOWITZ. Two soybean genotypes lacking lipoxygenase-1. *J. Am. Oil Chemist's Soc.* 58:583-586, 1981.

HILDEBRAND, D.F., R.T. VERSLUYS AND G.B. COLLINS. Changes in lipoxygenase levels during soybean embryo development. ***Plant Sci.*** 75:1-8, 1991.

HOFFMANN, L. V.; VIANNA BARROSO, P. A. Marcadores Moleculares como Ferramentas para Estudos de Genética de Plantas, por Lúcia Vieira Campina Grande, 35p, 2006. (Embrapa Algodão. Documentos, 147)

KEIM, P.; OLSON, T.C.; SHOEMAKER, R.C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. ***Soybean Genetics Newsletter***, v.15, p.150-152, 1988.

KEIM, P; OLSON, T.C.; SHOEMAKER, R.C. RFLP mapping in soybean: Association between marker loci and variation in quantitative traits. *Genetics* 126:735-742, 1990.

KIKUCHI, A. Tagging of slow rusting genes for leaf rust, Lr34 and Lr46, using microsatellite markers in wheat. *Jircas Annual Report*. p.47-48, 2001.

KIM M Y, HA B K, JUN T H, HWANG E Y, VAN K, KUK Y I, LEE S K. Single nucleotide polymorphism discovery and linkage mapping of lipoxygenase-2 gene Lx2 in soybean. *Euphytica*, 135:169-177, 2004.

KIM Y.S.; MOON J. K.; CHO, J. H.; KIM, H. T.; PARK, K. Y.; KIM, S. J. Improvement of special characters on three elite soybean cultivars by markers-assisted selection. *Treat. Of Crop. Sci.* 7:197-210, 2006.

KITAMURA, K. Biochemical of lipoxygenase lacking mutants, L1-Less, L2-Less and L3-Less soybeans. ***Agricultural and Biological Chemistry***, Tokyo, v.48, n.9, p.2339-2346, 1984.

KONING, G. J. & J. I. WELLER. Efficiency of direct selection on quantitative trait loci for a two-trait breeding objective. *Theor. Appl. Genet.* v.88, p.669–677, 1994.

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*, v.124, p.743-56, 1990.

LANZA, M. A. Marcadores moleculares RAPD na introgressão de genes para ausência de lipoxigenases e da proteína A5A4B3 em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 57 p. 1995.

LARK, K.G., J.M. WEISEMANN, B.F. MATTHEWS, R. PALMER, K. CHASE, AND T. MACALMA. A genetic map of soybean (*Glycine max* L.) using an intraspecific cross of two cultivars: 'Minosy' and 'Noir 1'. *Theor Appl Genet* 86: 901-906, 1993.

LI, Z.; JAKKULA, L.; HUSSEY, R.S.; TAMULONIS, J.P.; BOERMA, H.R. SSR mapping and confirmation of the QTL from PI96354 conditioning soybean resistance to southern root-knot nematode. **Theoretical and Applied Genetics**, v.103, p.1167-1173, 2001.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am J Hum Genet.** v.44, p.398-401.

MACK, A. J.; PETERMAN, T.K.; SIEDOW, J.N. **Current Topics in Biological and Medical Research**, v.13, p.127-154, 1987.

MANSUR, L.M., J.H. ORF, K. CHASE, T. JARVIK, P.B. CREGAN AND K.G. LARK. Genetic mapping of agronomic traits using recombinant inbred lines of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Crop Science* 36:1327-1336, 1996.

MARTINS, C. A. O.; SEDIYAMA, C. S.; MOREIRA, M. A.; REIS, M. S.; ROCHA, V. S. e OLIVEIRA, M. G. de A. Efeito da eliminação genética das lipoxigenases das sementes sobre as características agrônômicas da soja. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1389-1398, 2002.

MAUGHAN, P.J.; SAGHAI-MAROOF, M.A.; Buss, G.R. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. **Genome.** v.38, p.715-723. 1995.

MEKSEM, K.; NJITI, V.N.; BANZ, W.J.; IQBAL, M.J.; KASSEM, MY.M.; HYTEN, D.L.; YUANG, J.; WINTERS, T.A.; LIGHTFOOT, D.A. Genomic regions that underlie soybean seed isoflavone content. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.1, p.38-44, 2001.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. **Genome**. v.37, p.763-769. 1994.

NARVEL J.M., FEHR W.R., WELKE G.A. Agronomic and seed traits of soybean lines lacking seed lipoxygenases. **Crop Sci**. 38:926-928, 1998.

ORF, J.H.; CHASE, K.; ADLER, F.R.; MANSUR, L.M.; LARK, K.G. Genetics of soybean agronomic traits: II. Interactions between yield quantitative trait loci in soybean. **Crop Science**, v.39, p.1652-1657, 1999a.

ORF, J.H.; CHASE, K.; JARVIK, T.; MANSUR, L.M.; CREGAN, P.B.; ADLER, F.R.; LARK, K.G. Genetics of soybean agronomic traits: I. Comparison of three related recombinant inbred populations. **Crop Science**, v.39, p.1642-1651, 1999b.

PARAN, I; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theor Appl Genet**. v. 85, p.985-993. 1993.

PIAZZA, G. Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes. AOCs PRESS, Champaign Illinois, 232 p, 1996.

RICK, C.M. & FOBES, J.S. Association of an allozyme with nematode resistance. Report of the Tomato Genetics Cooperative 24:25. 1974.

SCHUSTER, I.; ABDELNOOR, R.V.; MARIN, S.R.R.; CARVALHO, V.P.; KIIHL, R.A.S.; SILVA, J.F.V.; SEDIYAMA, C.S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of a new major QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p.91-96, 2001.

SEBOLT, A.M.; SHOEMAKER, R.C.; DIERS, B.W. Analysis of a quantitative trait locus allele from wild soybean that increases seed protein concentration in soybean. **Crop Science**, v.40, p.1438-1444, 2000.

SEDIYAMA, C. S.; QUEIROZ, L. R.; MOREIRA, M. A.; REZENDE, S. T. Aldehyde production and physiological quality of soybean seeds lacking lipoxygenase isozymes. In. WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 5., 1994, Chiang Mai. **Proceedings**...Bangkok: Kasetsart University Press, p. 441-446, 1998.

SHARMA, P. C.; WINTER, P.; BÜNGER, T.; HÜTTEL, B.; WEINGARD, F.; WEISING, K.; KAHL, G. Abundance and polymorphism of di, tri and tetranucleotide tandem repeats in chickpea (*Cicer arietinum* L.) **Theor. Appl. Genet.**, v. 90, p. 90-96, 1995.

SHIBATA, D.; STECZKO, J.; DIXON, J. E.; ANDREWS, P. C.; HERMODSON, M.; AXELROD, B. Primary structure of soybean lipoxygenase L-1. **J. Biol. Chem.**, Vol. 262, Issue 21, 10080-10085, Jul, 1987

SHIBATA, D.; STECZKO, J.; DIXON, J. E.; ANDREWS, P. C.; HERMODSON, M.; AXELROD, B. Primary structure of soybean lipoxygenase L-2. **J. Biol. Chem.**, Vol. 263, Issue 14, 6816-6821, 05, 1988.

SHOEMAKER, R.C. AND J.E. SPECHT. Integration of the soybean molecular and classical genetic linkage groups. *Crop Sci.* 35:436-446, 1995.

SILVA, L. A. S. Herança e relações genéticas entre densidade da semente, teores de proteína e óleo e produtividade em soja. Tese (Doutorado), ESALQ. 170 p, 2008.

SOLLER, M. & BECKMANN, J.S. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theoretical Applied Genetics* 67:25-33, 1983.

SONG, Q.J.; MAREK, L.F.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; CONCIBIDO, V.C.; DELANNAY, X.; SPECHT, J.E.; CREGAN, P.B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.122-128, 2004.

START, W. G.; MA, Y.; POLACCO, J. C.; HILDEBRAND, D. F.; FREYER, G. A.; ALTSCHULER, M. Two soybean seed lipoxygenase nulls accumulate reduced levels of lipoxygenase transcripts. **Plant Mol. Biol.** 7:11-23, 1986.

STAUB, J.E, SERQUEN, F.C., GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience**, Alexandria, v.31, n.5, p.729-740, 1996.

SUDA, I.; HAJIKA, M.; NISHIBA, Y.; FURUTA, E.; IGITA, K. Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxygenase isozymes in soybean seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 43, p. 742-747, 1995.

TAJUDDIN, T.; WATANABE, S.; YAMANAKA, N.; HARADA, K. Analysis of quantitative trait loci for protein and lipid contents in soybean seeds using recombinant inbred lines. **Breeding Science**, v.53, p.133-140, 2003.

TANKSLEY, S.D.; MILLER, J.; PATERSON, A.; BERNATSKY, R. Molecular mapping of plant chromosomes. In: GUSTAFSON, J.P.; APPELS, R. (Eds.). **New York: Plenum Press**, p.157-173, 1988.

VOS, P. HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. VAN DE; HORNER, M.; FRITJERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic acids Research**. v. 23, p.4407-4414. 1995.

WANG, W. H.; TAKANO, T.; SHIBATA, D; KITAMURA, K.; TAKEDA, G. Molecular basis of a null mutation in soybean lipoxygenase 2: substitution of glutamine for an iron-ligand histidine. **Proc Natl Acad Sci USA** 91: 5828-5832, 1994.

WELLER, J.I.; FERNANDO,R.L. Strategies for the improvement of animal production using marker-assisted selection. In.: Schook, L.B.; Lewin, H.A.; McLaren, D.G. (eds) *Gene mapping: strategies, techniques and applications*. New York, Marcel Decker, p.305-328. 1991.

WILLIAMS, K. A.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers re useful as genetic markers. **Nucleic. Acids Res.** v.18, p.6531-6535. 1990.

YENOFISKY R. L.; FINE M.; LIU, C. Isolation and characterization of a soybean (*Glycine max*) lipoxygenase-3 gene. **Mol Gen Genet**, 211: 215-222, 1988.

ZHANG, W.-K.; Y.-J. WANG, G.-Z. LUO, J.-S. ZHANG, C.-Y. HE, X.-L. WU, J.-Y. GAI E S.-Y. CHEN. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. *Theor. Appl. Genet.* 108:1131-1139, 2004.