

LUCINETE REGINA COLOMBO

ACÚMULO DE ISOFLAVONAS DURANTE O ENCHIMENTO DO GRÃO DE
SOJA E MAPEAMENTO DE LOCOS QUE CONTROLAM ESSA
CARACTERÍSTICA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004

LUCINETE REGINA COLOMBO

ACÚMULO DE ISOFLAVONAS DURANTE O ENCHIMENTO DO GRÃO DE
SOJA E MAPEAMENTO DE LOCOS QUE CONTROLAM ESSA
CARACTERÍSTICA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 12 de março de 2004.

Prof. Maurilio Alves Moreira
(Conselheiro)

Prof. Wagner Campos Otoni
(Conselheiro)

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva

Dra. Lucimara Chiari

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Orientador)

Dedico este trabalho

A Deus, por ter me abençoado com a mais sublime das graças: a maternidade.

À minha família, que, com extrema compreensão e amor, me ajudou a superar os momentos difíceis para a execução deste trabalho.

À minha filha Mariana, que, com seu sorriso me fazia esquecer os inúmeros problemas enfrentados.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida e por tudo que ela representa.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realização do Curso.

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

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros, com toda a minha admiração, pela orientação, pelos ensinamentos e incentivo que foram indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Maurilio Alves Moreira, pelos conselhos, ensinamentos e presteza.

Ao Professor Wagner Campos Otoni, pelo aconselhamento e críticas construtivas.

À Dra. Lucimara Chiari, pela amizade, pelos ensinamentos e ajuda prestada.

Ao professor Cosme Damião Cruz, pelos ensinamentos e convívio durante as análises estatísticas.

Ao Newton Deniz Piovesan, pela colaboração e pela agradável convivência.

À Inês, pela amizade, pelos conselhos e ensinamentos.

Ao casal Márcia e Adésio, pela amizade e pela assessoria nas análises e também na interpretação dos resultados.

À Beatriz, pela amizade e pelo valoroso empenho nos trabalhos de laboratório.

Ao Luciano e a Tais, pela amizade, companheirismo e pela oportunidade de troca de conhecimentos.

Aos colegas de laboratório com os quais tive o prazer de trabalhar e conviver: Rita, Fernanda, Telma, Ana Cristina, Valéria, Francismar, Andréia, Cândida, Francisco, Simone, Jose, Gustavo, João Paulo, Fábio, Klever, Demerson, Luciane, Marcinha, Magda, Pedro Ivo, Reginaldo, Thiago, Vagner, Jander, Raniele, Aloísio, Vilmar e muitos outros.

A todos os professores, funcionários e colegas do Curso de Fisiologia vegetal, pela agradável convivência.

À Tais, Yaska e Daniele, que fizeram de sua casa meu segundo lar em Viçosa.

Às pessoas mais importantes na minha vida, meus familiares, pelo apoio constante, compreensão, convivência e pelo imenso amor que me dedicam.

A todos aqueles, estudantes, professores e funcionários, que contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

LUCINETE REGINA COLOMBO, filha de Hugo Colombo e Margarida Sala Colombo, nasceu em 5 de março de 1971, em Ocaçu, Estado de São Paulo, Brasil.

Em março de 1996, graduou-se em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Londrina, Estado do Paraná.

Em dezembro de 1996, concluiu o Bacharelado em Ciências Biológicas, também pela Universidade Estadual de Londrina, Estado do Paraná.

Em março de 1997, iniciou o Curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa, tendo defendido tese em 10 de março de 1999.

Em abril de 1999, iniciou o curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa, tendo defendido tese em 12 de março de 2004.

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT | x |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1. Isoflavonas..... | 3 |
| 2.2. Sintase de Isoflavona..... | 6 |
| 2.3. Marcadores Moleculares..... | 7 |
| 2.3.1. Marcadores RAPD..... | 8 |
| 2.3.2. Marcadores Microsatélites..... | 8 |
| 2.4. Mapeamento Genético..... | 9 |
| 2.5. Identificação de QTL..... | 10 |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 11 |
| CAPÍTULO 1 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA SINTASE DE ISOFLAVONA E ACÚMULO DE ISOFLAVONAS DURANTE O ENCHIMENTO DO GRÃO DE SOJA..... | 15 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 2.1. Material Genético e Condições de Cultivo das Plantas..... | 17 |
| 2.2. Extração de Isoflavonas e Análises por HPLC..... | 18 |
| 2.3. Extração de RNA Total..... | 19 |
| 2.4. Síntese da Primeira Fita de cDNA..... | 20 |
| 2.5. Construção dos <i>Primers</i> Específicos..... | 20 |
| 2.6. Amplificação e Separação dos Fragmentos RT-PCR..... | 21 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 22 |
| 3.1. Acúmulo de Isoflavonas Durante o Enchimento do Grão de Soja..... | 22 |
| 3.2. Expressão do Gene que Codifica a IFS Durante o Enchimento do Grão de Soja..... | 29 |

| | |
|--|----|
| 4. CONCLUSÕES..... | 32 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 33 |
| CAPÍTULO 2 - MAPEAMENTO DE LOCOS QUE CONTROLAM O CONTEÚDO DE ISOFLAVONAS EM SOJA..... | 36 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 36 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 39 |
| 2.1. Material Genético e Cruzamentos..... | 39 |
| 2.2. Extração e Quantificação das Isoflavonas de Sementes de Soja..... | 39 |
| 2.3. Análise do Teor de Proteína..... | 40 |
| 2.4. Extração de DNA..... | 41 |
| 2.5. Amplificação e Análise do DNA pela Técnica de Microsatélites..... | 42 |
| 2.6. Amplificação do DNA pela Técnica de RAPD..... | 42 |
| 2.7. Construção do Mapa de Ligação Genética..... | 43 |
| 2.8. Identificação e Mapeamento de QTLs..... | 43 |
| 2.8.1. Análise de Marca Simples..... | 43 |
| 2.8.2. Mapeamento por Intervalo Composto..... | 44 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 45 |
| 3.1. Detecção de Polimorfismos e Seleção dos <i>Primers</i> de Microsatélites e RAPD..... | 45 |
| 3.2. Mapa de Ligação Genética..... | 46 |
| 3.3. Análise do Teor de Isoflavonas e Proteína Total..... | 48 |
| 3.4. Associação entre Marcadores e QTLs..... | 51 |
| 4. CONCLUSÕES..... | 57 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 59 |

RESUMO

COLOMBO, Lucinete Regina, D. S. Universidade Federal de Viçosa, março 2004. **Acúmulo de isoflavonas durante o enchimento do grão de soja e mapeamento de locos que controlam essa característica.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Conselheiros: Maurilio Alves Moreira e Wagner Campos Otoni

Este trabalho foi realizado com a linhagem BARC-8 e a variedade comercial IAC-100, com os objetivos de: analisar a expressão do(s) gene(s) que codifica(m) a(s) enzima(s) sintase de isoflavona (IFS) em soja, e avaliar o acúmulo de isoflavonas ao longo do enchimento do grão em plantas cultivadas em duas diferentes temperaturas; mapear e identificar marcadores do tipo microssatélites e RAPD ligados a QTLs associados à determinação do conteúdo de isoflavonas em sementes de soja. Em um primeiro experimento, as plantas da linhagem BARC-8 e da variedade comercial IAC-100 foram cultivadas em dois regimes de temperaturas: 33/22 e 28/13 °C – dia/noite. Foram detectadas seis formas de isoflavonas ao longo do enchimento do grão de soja (daidzina, genistina, glicitina, malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina) tanto para IAC-100 como para BARC-8. Os resultados das análises de variância indicaram ter havido variação significativa para teor de isoflavonas em função do genótipo, da temperatura e dos estádios de desenvolvimento, bem como interação entre os três fatores analisados. A análise da cinética de acúmulo do RNA de IFS, pela técnica de RT-PCR, evidenciou que não há uma relação entre o acúmulo de isoflavonas e a quantidade de transcritos para IFS durante o enchimento do grão. Estudos posteriores deverão ser conduzidos, visando fazer uma análise quantitativa, para poder inferir como se comporta a expressão da IFS ao longo do enchimento do grão e se ocorre influência da temperatura sobre o acúmulo do seu transcrito. No segundo experimento, foi utilizada uma população de 93 plantas F₂, obtidas do cruzamento entre BARC-8 e IAC-100, que são contrastantes para os teores de daidzina, genistina, malonildaidzina, malonilgenistina, isoflavonas totais e proteína. Os teores das isoflavonas foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência e o teor protéico pelo método de Kjeldahl. A população foi analisada, utilizando-se marcadores

microssatélites e RAPD. Foram obtidos 22 grupos de ligação pouco saturados, contendo 82 marcadores, além de 25 marcas não ligada. Na análise de marca simples foram identificados 13 marcadores que explicaram a variação dos teores de daidzina. Destes, o marcador Satt318 explicou 17,39%. Na regressão múltipla, as marcas Satt318, Satt232 e Satt518 explicaram, juntas, cerca de 31,5% desta característica. Seis marcadores explicaram a variação dos teores de genistina. Destes, o Satt318 explicou 16,05% da variação. Na análise de regressão múltipla, as marcas Satt318, Satt350, Satt127 e OPK20 explicaram, juntas, cerca de 34% da variação. Onze marcadores foram identificados para malonildaidzina. Destes, o Satt318 explicou 16,13%. Na análise de regressão múltipla, as marcas Satt318, Satt232, Satt417 e Satt197 explicaram, juntas, cerca de 33% da variação. Dezesesseis marcadores foram encontrados para malonilgenistina. Destes, o Satt318 explicou 12,05% da variação. Na análise de regressão múltipla, as marcas Satt318, Satt468, Satt495, Satt350, Satt127 e Satt499 explicaram, juntas, cerca de 45% da variação. Dez marcadores foram identificados para isoflavona total. Destes, o Satt318 explicou 13,59% da variação. Na análise de regressão múltipla, as marcas Satt318, Satt468 e OPAW04 explicaram, juntas, cerca de 26% da variação. Sete marcadores foram identificados para proteína total. Destes, o OPK20 explicou 10,06%. Na análise de regressão múltipla, as marcas OPK20, Satt512, OPU02 e Satt398 explicaram, juntas, cerca de 26% da variação. No mapeamento por intervalo composto, foi identificado um único QTL associado ao teor da isoflavona daidzina no grupo de ligação K, que explicou 28% desta característica. As marcas que mais explicaram as diferentes características avaliadas não foram alocadas no mapa de ligação e, estudos posteriores deverão ser conduzidos, visando aumentar o grau de saturação do mapa. Isto poderá permitir a identificação de QTLs para as diferentes características analisadas.

ABSTRACT

COLOMBO, Lucinete Regina, D. S., Universidade Federal de Vicosa, March 2004. **Accumulation of isoflavone during soybean seed filling and mapping of loci controlling this trait.** Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Committee members: Maurilio Alves Moreira and Wagner Campos Otoni.

The soybean line BARC-8 and the commercial cultivar IAC-100 were used in this study in order to analyze the expression of the genes encoding the enzyme isoflavone syntase (IFS) in soybean, and to evaluate the accumulation of isoflavone during the seed filling in soy plants grown under two different temperatures, as well as to map and identify RAPD and microsatellite markers linked to the QTLs associated to the determination of the isoflavone contents in soybean. In the first experiment, the plants were grown under two temperature regimes: 33/22 and 28/13 °C - day/night. Six isoflavone forms were observed along the seed filling (daidzin, genistin, glycitin, malonildaidzin, malonilgenistin and malonilglycitin) in IAC-100 and BARC-8. The results of the variance analyses showed a significant variation in isoflavone content as a function of the genotype, temperature and the stage development, as well as an interaction among those three analyzed factors. A qualitative analysis of the accumulation kinetics of the isoflavone syntase RNA by the RT-PCR technique showed no relationship between isoflavone accumulation and the transcripts for IFS during seed filling. Further quantitative analysis should be conducted to determine the way IFS expression varies along the seed filling, and to verify if there is any influence of the temperature on its transcript accumulation. In the second experiment, a population of 93 F₂ plants were used. These plants were obtained from the crossing between BARC-8 and IAC-100, that are contrasting for the contents of daidzin, genistin, malonildaidzin, malonilgenistin, total isoflavones and protein. The isoflavone contents were determined by high performance liquid chromatography, and the protein content by the Kjeldahl method. The DNA of the plants was extracted and analyzed by RAPD and microsatellite markers. Twenty two linkage groups containing 82 markers in addition to 25 non-linked genetic markers were obtained. In the single marker analysis, thirteen markers explaining the variation in daidzin contents were identified. Among them, marker Satt318 explained 17.39% of the phenotypic variation. In

the multiple regression analysis, markers Satt318, Satt232 and Satt518 together explained about 31.5%. Six markers explained the variation in genistin contents. From these, Satt318 explained 16.05% of the variation. In the multiple regression analysis, markers Satt318, Satt350, Satt127 and OPK20 together explained about 34%. A total of eleven markers for malonil daidzin were identified. Among those, Satt318 explained 16.13% of the variation. In the multiple regression analysis, the markers Satt318, Satt232, Satt417 and Satt197 together explained about 33%. Sixteen markers were found for malonilgenistin. From those, Satt318 explained 12.05% of the variation. In the multiple regression analysis, markers Satt318, Satt468, Satt495, Satt350, Satt127 and Satt499 together explained about 45%. Ten markers were identified for total isoflavone. From those, Satt318 explained 13.59% of the variation. In the multiple regression analysis, markers Satt318, Satt468 and OPAW04 together explained about 26%. Seven markers were identified for total protein. Among those, OPK20 explained 10.06%. In the multiple regression analysis, markers OPK20, SATT512, OPU02 and Satt398 together explained about 26% of the variation. In the interval composite mapping, just one QTL associated to daidzin content in linkage group K was identified, which explained 28% of the variation of this trait. The genetic markers which explained a higher amount of the variation of the different traits evaluated were not allocated in the linkage map. Further studies are needed, which should target the increase of the map saturation level. This will probably allow the identification of other QTLs for the different traits analyzed.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), leguminosa originária da China, é, um dos produtos agrícolas de maior importância no Brasil, ocupando lugar de destaque nas exportações. Atualmente, cultiva-se soja em praticamente todo território nacional. Isso se deve principalmente ao grande número de cultivares disponíveis e adaptados a todas as regiões brasileiras. É uma cultura de grande interesse mundial devido à excelente combinação que apresenta entre produtividade, normalmente acima de duas toneladas por hectare, e teores de proteína e óleo no grão, em torno de 40% e 20%, respectivamente. Essa combinação contribuiu para a formação de um vasto complexo agro-industrial destinado ao processamento dos produtos derivados da soja.

Atualmente, a soja vem tendo destaque também por possuir diversos componentes biologicamente ativos, estando entre os alimentos funcionais mais estudados. Dentre estes compostos destacam-se as isoflavonas que são referidas como fitoestrógenos, que parecem ter efeitos moduladores dos receptores estrogênicos. Estudos sugerem a ação de isoflavonas na prevenção de câncer, doenças cardiovasculares, alívio dos sintomas da menopausa e osteoporose.

A soja é uma fonte rica e quase única de isoflavonas na dieta humana. Os teores de isoflavonas, nas sementes de soja, apresentam uma grande variabilidade devido a fatores genéticos e ambientais, tais como temperatura, local e ano de plantio. As isoflavonas são compostos secundários com limitada distribuição no reino vegetal, sendo quase inteiramente restrita às leguminosas. A presença desses compostos, aparentemente, depende da ocorrência da enzima sintase de isoflavona (IFS), sendo esta a enzima chave para biossíntese desses compostos, redirecionando os intermediários da via dos fenilpropanóides, de flavonas para isoflavonas.

Tradicionalmente, os programas de melhoramento genético da soja têm dado maior ênfase à produtividade, resistência a doenças e adaptabilidade. Os programas que visam ao desenvolvimento de cultivares de melhor qualidade nutricional têm se concentrado no aumento do teor de proteínas, na alteração da composição da fração óleo e na diminuição de fatores antinutricionais das sementes. O teor de isoflavonas não tem merecido grande atenção por parte

dos melhoristas até o presente, sobretudo no Brasil, onde as informações sobre esta característica são raras e pouco conclusivas.

O avanço das técnicas de biologia molecular tem permitido a identificação de marcadores genéticos que são fundamentais para o monitoramento dos fatores genéticos que determinam um caráter, o qual muitas vezes é avaliado por processos analíticos onerosos e demorados. Marcadores genéticos ligados a genes que controlam o teor de isoflavonas podem ser usados para seleção indireta de alelos favoráveis, de forma mais eficiente que a seleção fenotípica direta, que é realizada por HPLC, sendo esta uma técnica demorada e trabalhosa.

A seleção de características agrônômicas monitorada por marcadores moleculares baseia-se no princípio de que se um gene, ou um grupo de genes, encontra-se ligado a um marcador genético de fácil identificação, esse marcador pode ser utilizado para selecionar a característica de interesse programas de melhoramento. Segundo Hayward *et al.* (1994), o método mais eficaz de determinar esse tipo de associação envolve a construção de mapas genéticos detalhados, nos quais podem ser localizadas regiões contendo locos para características quantitativas (QTLs).

A característica “teor de isoflavonas” ainda é pouco entendida do ponto de vista genético. Por este motivo o presente trabalho teve como objetivos: (i) analisar a expressão do(s) gene(s) que codifica(m) a(s) enzima(s) IFS em soja e avaliar o acúmulo de isoflavonas ao longo do enchimento do grão na variedades IAC-100 e na linhagem BARC-8, cultivadas sob dois regimes de temperatura; (ii) mapear e identificar marcadores do tipo microssatélites e, ou, RAPD ligados a QTLs associados à determinação dessa característica em sementes de soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Isoflavonas

As isoflavonas são fenóis heterocíclicos, muito semelhantes estruturalmente aos hormônios esteróides estrogênicos (Pratt e Birac, 1979). Os compostos fenólicos são caracterizados por pelo menos um anel aromático (C₆) contendo uma ou mais hidroxilas (Strack, 1997).

As isoflavonas são metabólitos secundários sintetizados por um ramo da via dos fenilpropanóides. Compartilham uma via biossintética comum com os flavonóides, até os substratos liquiritigenina e naringenina. Outros ramos dessa via produzem lignina e antocianinas (Jung *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003) (Figura 1). A via de síntese de gliciteína não foi totalmente elucidada, provavelmente é derivada de isoliquiritigenina (Latunde-Dada *et al.*, 2001).

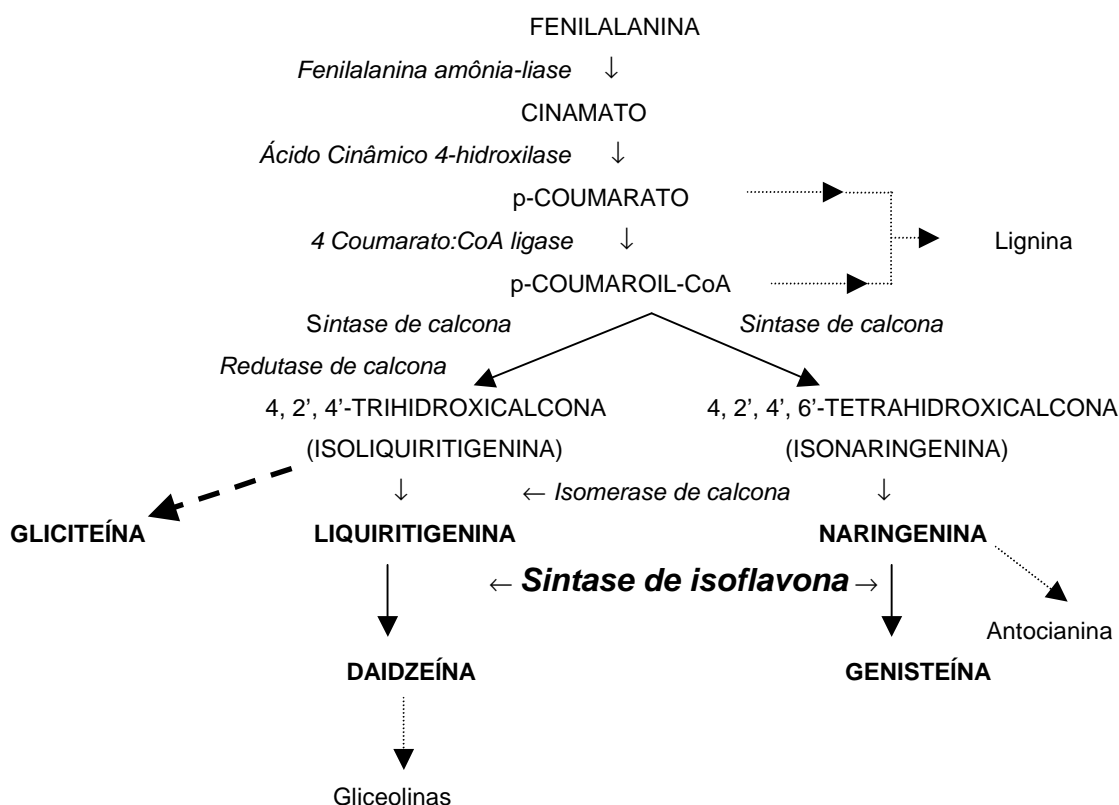


Figura 1 – Diagrama simplificado da via dos fenilpropanóides mostrando intermediários e enzimas envolvidas na síntese de isoflavonas (em itálico). As setas pontilhadas representam múltiplos passos enzimáticos.

As isoflavonas têm limitada distribuição no reino vegetal e estão quase que inteiramente restritas às leguminosas, dentre as quais a soja cultivada (*Glycine max*) (Dewick, 1994). As principais isoflavonas encontradas em soja são: genistina, daidizina, glicitina e suas formas acetiladas e maloniladas: 6"-O-acetilgenistina, 6"-O-acetildaidzina, 6"-O-acetilglicitina, 6"-O-malonilgenistina, , 6"-O-malonildaidzina, 6"-O-malonilglicitina, bem como suas agliconas correspondentes, ginisteína, daidzeína e gliciteína (Bourquin, 1996) (Figura 2). Segundo Graham (1991), na semente de soja, as isoflavonas são armazenadas no vacúolo na forma de glicosil e malonil-glicosil conjugados. As formas agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) e acetilglicosiladas (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina) resultam do processamento da soja e produtos da soja ou do preparo de amostras para análise (Griffith e Collison, 2001).

| R1 | R2 | Compostos | | Agliconas |
|----|------------------|------------------------|------------------|-------------|
| H | H | Daidzeína | | |
| OH | H | Genisteína | | |
| H | OCH ₃ | Gliciteína | | |
| R3 | R4 | R5 | Compostos | Glicosídeos |
| H | H | H | Daidzina | |
| OH | H | H | Genistina | |
| H | OCH ₃ | H | Glicetina | |
| H | H | COCH ₃ | Acetildaidzina | |
| OH | H | COCH ₃ | Acetilgenistina | |
| H | OCH ₃ | COCH ₃ | Acetilglicitina | |
| H | H | COCH ₂ COOH | Malonildaidzina | |
| OH | H | COCH ₂ COOH | Malonilgenistina | |
| H | OCH ₃ | COCH ₂ COOH | Malonilglicitina | |

Figura 2 – Estruturas químicas das 12 formas de isoflavonas.

A distribuição e os níveis relativos de isoflavonas específicos em plântulas de soja são característicos de cada órgão (Graham, 1991). Na semente de soja, o conteúdo total de isoflavonas é cinco a seis vezes maior no hipocótilo que nos cotilédones, sendo a glicitina e seus derivados de ocorrência exclusiva do hipocótilo. Por outro lado, no tegumento da semente de soja não

foram encontradas isoflavonas. O acompanhamento do acúmulo de isoflavonas durante o desenvolvimento da semente de soja mostrou que malonilgenistina e genistina acumulam muito mais no estágio final de desenvolvimento da semente, enquanto malonildaidzina e daidzina acumulam com uma taxa constante e malonilglicitina e glicitina mantêm seus níveis durante todo o período (Kudou *et al.*, 1991).

Os teores e a composição de isoflavonas variam em função do genótipo e das condições ambientais durante o cultivo (Eldridge e Kwolek, 1983; Wang e Murphy, 1994; Carrão-Panizzi e Kitamura, 1995; Carrão-Panizzi, 1996; Choi *et al.*, 1996; Aussenac *et al.*, 1998; Carrão-Panizzi *et al.*, 1999; Hocck *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002). Um dos fatores ambientais que provocam uma redução significativa nos teores de isoflavonas no grão de soja é a temperatura mais alta durante o enchimento dos grãos (Kitamura *et al.*, 1991; Carrão-Panizzi, 1996 e Tsukamoto *et al.*, 1995). Foi observado por Tsukamoto *et al.* (1995), em variedades crescidas a temperaturas mais altas, redução de 14 a 16 vezes na semente inteira, enquanto que no hipocótilo a redução foi de três a seis vezes. Esses mesmos autores verificaram que o conteúdo de isoflavonas no hipocótilo permaneceu alto quando as plantas de soja foram cultivadas em campo e decresceu quando cultivadas em câmaras de crescimento. Eles sugerem que possivelmente insetos ou microrganismos estimulem a produção de isoflavonas. Além da temperatura, e possivelmente estresses bióticos, a luz também influencia a distribuição de isoflavonas em soja (Graham, 1991).

As isoflavonas exibem ampla atividade biológica nas plantas, desempenham papel importante nas interações planta-microrganismo e planta-inseto. Está bem estabelecida a existência de trocas de sinais entre rizóbio e leguminosas (Denarie *et al.*, 1996). A planta secreta isoflavonas na rizosfera e esses metabólitos são percebidos pela bactéria (Philips, 1992). As isoflavonas interagem com uma proteína regulatória do rizóbio, Nod D, que ativa a transcrição de vários genes *nod* no rizóbio (Smit *et al.*, 1992). O resultado é a produção de lipoquitooligossacarídeos, chamados fatores *nod*, que em baixas concentrações induzem a formação de nódulos (Stokkermans e Peters, 1994).

Um outro papel das isoflavonas é verificado durante a resposta de resistência a doenças. Algumas fitoalexinas são isoflavonas com atividade antifúngica e antibacteriana (Rivera-Vargas *et al.*, 1993). Além disso,

aminoácido 300. O *ínton* da IFS1 tem 218 bp, e o *ínton* da IFS2 tem 135 bp, apresentando 46% de similaridade entre eles (Jung *et al.*, 2000).

Foram isolados genes homólogos à IFS de soja em outras leguminosas, incluindo trevo vermelho, trevo branco, feijão, alfafa, lentilha, ervilha e tremoço, assim como em beterraba, uma espécie não leguminosa. Todas as proteínas IFS codificadas por estes genes, apresentam alta similaridade na seqüência de aminoácidos que varia de 95 a 99% , para ambas as IFS. O alto grau de conservação pode refletir a limitação funcional necessária para a enzima ser capaz de carrear a migração aril, em uma única reação (Jung *et al.*, 2000).

Para testar a função do gene da IFS de soja em planta não leguminosa, foi introduzida a região codificante do gene IFS1 em plantas de *Arabidopsis*. Estas plantas expressaram a enzima IFS ativa, convertendo naringenina em genisteína. O substrato naringenina não foi detectado em plantas controle e nas transformadas, sugerindo que a IFS compete com outras enzimas da via dos fenilpropanóides por este intermediário (Jung *et al.*, 2000).

A expressão da enzima IFS de soja em plantas de tabaco resultou na produção de genisteína. Entretanto, tal atividade só ocorreu em tecidos que sintetizam antocianinas, como por exemplo o tecido floral. Em células de milho, fatores de transcrição que regulam genes da via de síntese de antocianinas foram requeridos em adição ao gene da IFS de soja para a síntese de genisteína (Yu *et al.*, 2000). Os mesmos fatores de transcrição foram expressos em sementes de soja e alguns genes da via dos fenilpropanóides foram ativados, levando ao aumento de daidzeína e de isoflavonas totais, apesar da redução de genisteína (Yu *et al.*, 2003).

2.3. Marcadores Moleculares

Diversas técnicas de biologia molecular estão atualmente disponíveis para a detecção de variabilidade genética em nível de seqüência de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético. Estas técnicas possibilitaram o surgimento de vários tipos de marcadores moleculares que têm sido utilizados para cobrir o genoma de diversos tipos de organismos. Tais marcadores podem ser utilizados tanto para estudos genéticos como no melhoramento de plantas, animais e microrganismos.

O primeiro marcador molecular a ser estudado foi os marcadores RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphisms”), que foram amplamente empregados nas mais variadas áreas da genética animal, vegetal e de microrganismos. O desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando a DNA polimerase (PCR) levou ao aparecimento de outras classes de marcadores moleculares, que requeriam pequenas quantidades de DNA para a amplificação e análise, tais como: RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), microssatélites e AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”).

2.3.1. Marcadores RAPD

Os marcadores RAPD são fragmentos discretos de DNA, amplificados pela reação da polimerização em cadeia a partir de *primers* únicos de seqüência arbitrária e conteúdo de CG maior que 50%, que se ligam ao DNA genômico em dois sítios, em fitas opostas do DNA molde. Os produtos de amplificação são formados quando estes sítios estiverem separados por uma distância amplificável (que pode variar de 200 a 2000 pb). O número e o tamanho dos fragmentos amplificados dependem da seqüência do *primer* usado e da seqüência de bases do DNA molde (Tingey e Del Tufo, 1993). Os polimorfismos resultam de mudanças na molécula de DNA que alteram os sítios de ligação dos *primers*, o que pode alterar o comprimento do fragmento compreendido entre os dois sítios ou mesmo impedir que a amplificação ocorra. Esta técnica não permite a distinção entre indivíduos heterozigotos e homozigotos, sendo a sua herança considerada dominante.

2.3.2. Marcadores Microssatélites

Microssatélites ou “Single Sequence Repeats (SSR)” consistem de agrupamentos de seqüências repetidas em séries presentes no genoma de diversos organismos, sendo que o número de seqüências repetidas varia para cada organismo e para cada região do genoma. Os microssatélites são flanqueados por seqüências de DNA extremamente conservadas entre genótipos da mesma espécie. Assim, *primers* que sejam complementares às

regiões flanqueando os microssatélites podem ser usados para amplificar um determinado loco, via reação de polimerase em cadeia (PCR). Tendo em vista a expressão co-dominante e o multialelismo, os microssatélites constituem a classe mais informativa de marcadores moleculares (Tautz, 1989). A alta informação contida em loco SSR, aliada a sua transmissão co-dominante, potencial para automação e requerimento de pequena quantidade de DNA, fazem com que os SSRs sejam considerados marcadores genéticos mais indicados (Rafalski e Tingey, 1993).

2.4. Mapeamento Genético

O mapeamento genômico de uma espécie consiste na produção de um conjunto ordenado de informações sobre as seqüências de DNA que cobre todo o genoma. O mapeamento genético é baseado na hipótese de que a co-transmissão de dois marcadores reflete a proximidade entre eles, criando a possibilidade de se ordenar linearmente a informação genética ao longo dos cromossomos e determinar a distância entre os genes ligados. A determinação da distância e da ordem é feita com base na taxa de recombinação genética.

Os requisitos básicos para a construção de um mapa genético são a obtenção de populações segregantes e a utilização de vários marcadores que sejam polimórficos entre os progenitores e que apresentem segregação Mendeliana na progênie. Mapas de ligação são construídos pela análise da segregação dos marcadores em uma população segregante, isto é, em desequilíbrio de ligação gênica.

Idealmente, no mapa o número de grupos de ligação obtidos deve coincidir com o número de cromossomos do organismo e todos os marcadores genéticos devem estar alocados nos diversos grupos de ligação, sugerindo que todas as regiões do genoma estejam representadas.

Os mapas disponíveis para a soja são, em sua maioria, feitos a partir de cruzamentos interespecíficos entre *Glycine max* e *Glycine soja* (Shoemaker, 1994; Keim *et al.*, 1997; Cregan *et al.*, 1999). Embora o cruzamento interespecífico seja interessante para a construção de mapas em si, não o é, para os programas de melhoramento que se baseiam exclusivamente em genótipos de *G. max* (Mansur *et al.*, 1993). O primeiro trabalho de mapeamento

intra-específico em *G. max* foi construído com marcadores RFLP (Lark *et al.*, 1993).

2.5. Identificação de QTL

Muitos caracteres de importância econômica estão sob o controle genético complexo, envolvendo vários genes. Esses caracteres são denominados poligênicos ou quantitativos. Para a maioria das características quantitativas, poucas informações existem sobre o número, a posição cromossômica, a magnitude do efeito e as interações dos locos que controlam a sua expressão. Esses locos são denominados QTL (“Quantitative Trait Loci”).

Segundo Prioul *et al.* (1997), os pré-requisitos para a detecção de QTLs são: estabelecer uma população de mapeamento que apresente variabilidade genética para a característica de interesse; estabelecer grupos de ligação genética para a população, pela análise da taxa de recombinação entre os marcadores moleculares e determinar valores fenotípicos para a característica de interesse em cada indivíduo da população.

A procura dos QTLs realiza-se mediante associações entre os marcadores segregantes e os valores fenotípicos das características. Se tal associação é identificada, significa que existe ligação fatorial entre o marcador e o QTL que afeta a característica.

A associação entre marcadores e QTLs pode ser detectada por meio de estatísticas simples como qui-quadrado, análise de variância, regressão linear, entre outras. Quando se dispõe de um número suficientemente grande de marcadores, ordenados em grupos de ligação, o mapeamento de QTLs, assim como a estimativa de seus efeitos, podem ser realizados por meio do método de mapeamento por intervalos, proposto por Lander e Botstein (1989). Ultimamente, vêm-se utilizando o método de mapeamento por intervalo composto (Zeng, 1994), que combina intervalos de mapeamento com funções de regressão múltipla. Assim, o teste estatístico formulado considera o efeito da presença de um QTL em um intervalo e é analisado independente de um QTL próximo, presente em outro intervalo. Desse modo, o processo seleciona especificamente QTLs únicos ligados a marcas específicas, isolando o efeito deste de outros QTLs que, porventura, estejam próximos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aussenac, T.; Lacombe, S.; Daydé, J. Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds: effects of variety and environment. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68 (suppl.), p. 1480S-1485S, 1998.
- Bourquin, L. D. Soya y cáncer. **Soyanoticias**, julho-setembro, p. 16-22, 1996.
- Carrão-Panizzi, M. Avaliação de cultivares de soja quanto aos teores de isoflavonóides. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 691-698, 1996.
- Carrão-Panizzi, M.; Kitamura, K. Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. **Breeding Science**, v. 45, n. 3, p. 295-300, 1995.
- Carrão-Panizzi, M.; Beléia, A. D. P.; Prudêncio-Ferreira, S. H.; Oliveira, M. C. N.; Kitamura, K. Effects of isoflavones on beany flavor and astringency of soymilk and cooked whole soybean grains. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 6, p. 1045-1052, 1999.
- Choi, J. S. C.; Kwon, T. W.; Kim, J. S. Isoflavone contents in some varieties of soybean. **Foods Biotechnology**, v. 5, p. 167-169, 1996.
- Cregan, P. B.; Jarvik, T.; Bush, R. C.; Shoemaker, R. C.; Lark, K. G.; Kahler, A. L.; Kaya, N.; Vantoai, T. T.; Lohnes, D. G.; Chung, J.; Spexht, J. E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, v.39, n.5, p.1464-1490, 1999.
- Denaire, J.; Debelle, F.; Prome, J. C. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 61, p. 503-535, 1996.
- Dewick, P. M. Isoflavonoids. In: Harborne, J. B. (Ed.). **The flavonoids: advances in rearch since 1986**. Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London, 1994, p. 117-238.
- Eldridge, A. C.; Kwolek, W. F. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31,p. 394-396, 1983.
- Graham, T. L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. **Plant Physiology**, v. 95, p. 594-603, 1991.
- Griffith, A. P.; Collison, M. W. Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid

- chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 913, p. 397-413, 2001.
- Hayward, M. D.; McAdam, N. J.; Jones, J. G.; Evans, C.; Evans, G. M.; Forster, J. W.; Ustin, A.; Hossin, K. G.; Quader, B.; Stammers, M.; Will, J. K. Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses. **Euphytica**, v.77, n.3, p. 269 – 275, 1994.
- Hocck, J. A.; Fehr, W. R.; Murphy, P. A.; Welke, G. A. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. **Crop Science**, v. 40, p. 48-51, 2000.
- Huang, J-S.; Barker, K. R. Glyceollin I in soybean-cyst nematode interactions. **Plant Physiology**, v. 96, p. 1302-1307, 1991.
- Jung, W.; Yu, O.; Lau, S-M. C.; O’Keefe, D. P.; Odell, J.; Fader, G.; McGonigle, B. Identification and expression of isoflavone synthase, the enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 208-212, 2000.
- Keim, P.; Scupp, J. M.; Travis, S.E.; Clayton, K.; Webb, D.M. A high-density soybean genetic map based upon AFLP markers. **Crop Science**, v.37, n.2, p.537-543, 1997.
- Kitamura, K., Igita, K., Kikuchi, A., Kudou, S., Okudo, K. Low isoflavone content in early maturing cultivars, so called Summer-type soybeans (*Glycine max* (L) Merrill). **Japanese Journal of Breeding**, v. 41, p. 651-654, 1991.
- Kudou, S.; Fleury, Y.; Weltl, D.; Magnolato, D.; Uchida, T.; Kitamura, K.; Okudo, K.; Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). **Agricultural and Biological Chemistry**, v.55, n.9, p.2227-2233, 1991.
- Lander, E. S.; Botstein, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v.121, n.1, p.185-199, 1989.
- Lark, K. G.; Weisemann, J. M.; Matthews, B. F.; Palmer, R.; Chase, K.; Macalma, T. A genetic map of soybean (*Glycine max* L. Merr.) using an intraspecific cross of two cultivars: ‘Minosy’ and ‘Noir 1’. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, n.8, p.901-906, 1993.
- Latunde-Dada, A.O.; Cabello-Hurtado, F.; Czittrich, N.; Didierjean, L.; Schopfer, C.; Hertkorn, N.; Werck-Reichart, D.; Ebel, J. Flavonoid 6-hydroxylase from soybean (*Glycine max* L.), a novel plant P-450 monooxygenase. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.1685-1688, 2001.
- Lee, S. J.; Yan, W.; Ahn J. K.; Chung, M. Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. **Field Crops Research**, v. 4150, p. 1-12, 2002.

- Liu, S.; Norris, D. M.; Hartwig, E. E.; Xu, M. Inducible phytoalexins in juvenile soybean genotypes predict soybean looper resistance in the fully developed plants. **Plant Physiology**, v. 100, p. 1479-1485, 1992.
- Mansur, L. M. L.; Lark, K. G.; Kross, H.; Oliveira, A. Interval mapping of quantitative trait loci for reproductive, morphological and seed traits of soybean (*Glycine max* L. Merr.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, n.8, p.907-913, 1993.
- Phillips, D. A. Flavonoids: Plant signals to soil microbes. **Recent Advances in Phytochemistry**, v. 26, p. 201-231, 1992.
- Pratt, D. E.; Birac, P. M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **Journal of Food Science**, v. 44, p. 1720-1722, 1979.
- Prioul, J.L.; Quarrie, S.; Causse, M.; Vienne, D. Dissecting complex physiological through the use of molecular quantitative genetics. **Journal of Experimental Botany**, v.48, p. 1151-1163, 1997.
- Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. **Trends in Genetics**, v.9, n.2, p.275-280, 1993.
- Rivera-Vargas, L. I., Schmitthenner, A. F., Graham, T. L. Soybean flavonoid effects on and metabolism by *Phytophthora sojae*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 4, p. 851-857, 1993.
- Shoemaker, R. C. RFLP map of soybean. In: Phillips, R. L.; Vasil, I. K.,(Eds.). **DNA- based markers in plants**. [s.l]: Kluwer Academic, p.290-309, 1994.
- Smit, G. V., Puvanesarajah, V., Carlson, R. W., Barbour, W. M., Stacey, G. *Bradyrhizobium japonicum nodDI* can be specifically induced by soybean flavonoids that do not induce the *nodYABCUIJ* operon. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 310-318, 1992.
- Steele, C. L.; Gijzen, M.; Qutob, D.; Dixon, R. A. Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 367, n. 1, p. 146-150, 1999.
- Stokkermans, T. J. W.; PETERS, N. K. *Bradyrhizobium elkanii* lipooligosaccharide signal induces complete nodule structures on *Glicine soja* Siebold et Zucc. **Planta**, v. 193, p. 413-420, 1994.
- Strack, D. Phenolic metabolism. In: Dey, P. M. (Ed.). **Plant biochemistry**. Academic Press Ltd., 1997, p. 387-416.
- Tautz, D. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v.17, n.13, p.6463-6471, 1989.

- Tingey, S.V.; Del Tufo, J.P. Genetic analysis with Random Amplified Polymorphic DNA markers. **Plant Physiology**, v.101, n.2, p.349-352, 1993.
- Tsukamoto, C.; Shimada, S.; Igita, K.; Kudou, S.; Kokubun, M.; Okubo, K.; Kitamura, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1184-1192, 1995.
- Yu, O.; Jung, W.; Shi, J.; Croes, R. A.; Fader, G. M.; McGonigle, B.; Odell, J. T. Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. **Plant Physiology**, v. 124, p. 781-793, 2000.
- Yu, O.; Shi, J.; Hession, A. O.; Maxwell, C. A.; McGonigle, B.; Odell, J. T. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. **Phytochemistry**, v.63, p. 753-763, 2003.
- Wang, H. J.; Murphy, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1674-1677, 1994.
- Zeng, Z. B. Precision mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, v.136, n.9, p.1457-1468, 1994.

CAPÍTULO 1

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA SINTASE DE ISOFLAVONA E ACÚMULO DE ISOFLAVONAS DURANTE O ENCHIMENTO DO GRÃO DE SOJA

1. INTRODUÇÃO

As isoflavonas são metabólitos secundários que são sintetizados pela via dos fenilpropanóides, e sua ocorrência é limitada a plantas leguminosas. Como a maioria dos metabólitos secundários, as isoflavonas desempenham funções que contribuem para uma melhor adaptação destas plantas, tais como: atividade antifúngica e antibacteriana, resistência a insetos e nematóides, além de desempenhar papel no processo de nodulação.

Atualmente, há grande interesse pelas isoflavonas, que têm sido associadas à prevenção e/ou tratamento de diversas doenças crônicas. Os efeitos benéficos associados às isoflavonas incluem a atenuação dos sintomas da menopausa, prevenção e tratamento da osteoporose, melhora dos níveis de colesterol do sangue e diminuição do risco de certos tipos de câncer e doenças coronarianas (Setchell, 1998; Messina, 2000).

A soja contém grande quantidade de isoflavonas, sendo a principal fonte desses compostos na dieta humana. As sementes “in natura” contêm os glicosídeos daidzina, genistina, glicitina e suas formas maloniladas 6”-O-malonildaidzina, 6”-O-malonilgenistina e 6”-O-malonilglicitina. Os 6”-O-acetilglicosídeos e agliconas resultam do processamento da soja e de seus produtos e podem também resultar do preparo de amostras para análise (Griffith e Collison, 2001).

Os teores e a composição de isoflavonas variam de acordo com a parte morfológica da semente da soja (cotilédone, hipocótilo e tegumento) (Kudou *et al.*, 1991). E, também, em função do genótipo e das condições ambientais durante o cultivo (Eldridge e Kwolek, 1983; Wang e Murphy, 1994; Carrão-Panizzi e Kitamura, 1995; Carrão-Panizzi, 1996; Choi *et al.*, 1996; Aussenac *et*

al., 1998; Carrão-Panizzi *et al.*, 1999; Hocck *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002). Um dos fatores ambientais que provocam uma redução significativa nos teores de isoflavonas no grão de soja é o cultivo em temperaturas mais altas durante o enchimento dos grãos (Kitamura, *et al.*, 1991; Carrão-Panizzi, 1996 e Tsukamoto *et al.*, 1995).

A ocorrência das isoflavonas limitada às leguminosas, aparentemente está correlacionada com a atividade da enzima IFS, que redireciona os intermediários da via dos fenilpropanóides, de flavonóides para isoflavonas. Foram identificados dois genes que codificam a IFS em soja. Com o crescente interesse pelas isoflavonas e com a identificação dos genes que codificam essa enzima chave da via biossintética, alguns autores (Jung *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003) viram a oportunidade de utilizar a engenharia metabólica para alterar a síntese de isoflavonas em leguminosas e de promover a sua síntese em não leguminosas. Esta modificação poderá afetar a resistência destas plantas a doenças e também a qualidade nutricional dos produtos alimentícios delas derivados.

O conhecimento sobre os fatores que controlam as variações em torno do caráter “teor de isoflavonas” é, ainda, incipiente. Estudos são necessários para determinar de que forma as mudanças ambientais influenciam os teores e o perfil de isoflavonas no grão de soja. Um dos mecanismos básicos de controle poderia ser pela modulação da atividade da enzima IFS.

O presente trabalho teve como objetivos analisar a expressão do gene que codifica a enzima IFS em soja e avaliar o acúmulo de isoflavonas ao longo do enchimento do grão na variedade IAC-100 e na linhagem BARC-8, cultivadas sob dois regimes de temperatura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Genético e Condições de Cultivo das Plantas

Para analisar a expressão do gene que codifica a IFS e o acúmulo de isoflavonas durante o enchimento do grão de soja, foi utilizada a linhagem BARC-8, com baixo teor de isoflavonas (Chiari, 2003), desenvolvida pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA-ARS, Beltsville, MD) (Leffel, 1992) e a variedade comercial IAC-100, desenvolvida pelo Instituto Agronômico de Campinas, a qual apresenta alto teor de isoflavonas, conforme descrito por Carrão-Panizzi e Kitamura (1995).

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, em vasos contendo três litros de solo previamente adubado, cultivando-se duas plantas por vaso. Até o início do período reprodutivo, elas foram cultivadas em uma mesma casa de vegetação e, então, transferidas para duas casas de vegetação: uma com sistema de ventilação, com temperatura máxima média de 28 °C e a mínima média, de 13 °C. Na outra, com sistema de aquecimento artificial, as temperaturas médias máxima e mínima foram de 33 e 22 °C, respectivamente. As medidas de temperatura, foram feitas diariamente, por meio de um termômetro que registra as temperaturas máxima e mínima do dia.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições e com arranjo fatorial (2x2x5), tendo como fatores analisados dois cultivares em dois ambientes de temperatura e cinco estádios de desenvolvimento da semente, num total de 20 tratamentos. As repetições foram constituídas de duas plantas por vasos.

Durante o desenvolvimento da semente, estas foram coletadas e agrupadas em quatro estádios de desenvolvimento, os quais foram definidos com base na massa fresca da semente: 1º – 0 a 75 mg; 2º – 76 a 150 mg; 3º – 151 a 225 mg; 4º – 226 a 300 mg. Além dos quatro estádios, coletou-se a semente madura. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C, para posteriores análises.

2.2. Extração de Isoflavonas e Análises por HPLC

O teor de isoflavonas de cada repetição foi determinado, tomando-se uma amostra de 25 sementes previamente liofilizadas, que foram moídas e amostras de 50 mg foram extraídas em 1000 μ L de metanol 80%, em microtubos de 1,5 mL. Para extrair as isoflavonas, os tubos foram agitados, por duas horas em agitador de tubo Rotator (Scientific Equipment Products) e mantidos à temperatura de 4°C. Após centrifugação a 10.144 g por 5 min, sob refrigeração, os extratos foram filtrados em membrana PTFE (0,45 μ m). O filtrado foi passado por coluna do tipo C18 e 20 μ L do eluato foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A análise por HPLC foi realizada em cromatógrafo SHIMADZU, série LC10, coluna Shim-pack CLC-ODS(M) (4,6 x 250 mm, SHIMADZU), mantida a 40 °C. A eluição foi realizada a um fluxo de 1,0 mL/min, em sistema gradiente de acetonitrila, utilizando duas soluções: A) ácido acético 0,1% em água Milli-Q e B) ácido acético 0,1% em acetonitrila. O sistema gradiente de eluição iniciou com 17% da solução B mantida por 1 min, elevando-se gradativamente para 20% em 11 min, depois para 24% em 11 min, 29% em 23 min, 35% em 2 min, 50% em 6 min. E por fim, elevou-se para 80%, gradativamente, durante 10 min, para a lavagem da coluna, retornando para 17% em 5 min, totalizando 70 min. A detecção dos compostos foi realizada por meio de detector espectrofotométrico a 260 nm e a identificação, por comparação com os tempos de retenção de padrões apropriados.

A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa. Padrões de daidzeína, genisteína e genistina foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA) e gliciteína, glicitina, daidzina, 6"-O-acetilgenistina, 6"-O-acetildaidzina, 6"-O-acetilglicitina, 6"-O-malonilgenistina, 6"-O-malonildaidzina, 6"-O-malonilglicitina, da FUJICCO CO., LTD (Tóquio, Japão).

Os resultados foram expressos em μ g de isoflavona por g de soja, com base na matéria seca, constituindo a média de duas repetições.

2.3. Extração de RNA Total

Todas as etapas de extração do RNA total foram efetuadas a 4°C e em condições livres de ribonuclease (RNase). O RNA total de sementes de soja foi extraído e purificado de acordo com procedimento proposto por Sambrook *et al.* (1989), porém com algumas adaptações ao protocolo original.

Aproximadamente 4 g de sementes, de cada estágio de desenvolvimento, foram macerados em nitrogênio líquido e transferidos para tubos Falcon de 50 mL. A cada amostra foram adicionados 18 mL de tampão NTES (NaCl 1M; Tris-HCl 0,01M, pH 7,5; EDTA 1mM e SDS 1%), 6 mL de fenol e 6 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após agitação por 15 min em agitador mecânico do tipo vórtex, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 min. A fase superior (contendo os ácidos nucléicos e pouca proteína) foi transferida para outro tubo. Para a purificação do RNA total, este foi precipitado pela adição de 1/10 do volume da fase aquosa de acetato de sódio (NaAc) 2M e dois volumes de etanol. A mistura foi homogeneizada e incubada a -20°C por 1 hora. Após centrifugação a 12.000 g, por 15 min, o precipitado foi lavado em etanol 70%, ressuspensão em 2,5 mL de água DEPC (água tratada com dietilpirocarbonato) e novamente centrifugado a 7.500 g, por 5 min. Ao sobrenadante foram adicionados 2,5 mL de solução de LiCl 4 M. A mistura foi incubada a -20°C por 4 - 6 horas e posteriormente centrifugada a 12.000 g por 30 min, e o precipitado, ressuspensão em 1,8 mL de água DEPC, adicionados de 0,2 mL de NaAc 2M e 3,6 mL de etanol. Após incubação a -20°C, por 4 - 6 horas e centrifugação a 12.000 g por 10 min, o precipitado contendo o RNA foi seco e ressuspensão em 600 µL de água DEPC e armazenado a -80°C até o seu uso.

A integridade do RNA total isolado foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, contendo 0,1 mg/mL de brometo de etídeo. A presença de duas bandas bem distintas indica a preservação dos RNA ribossômicos 18S e 28S, forte indício que não há degradação apreciável das amostras de RNA.

A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro a 260 nm. Os valores confiáveis de absorbâncias a 260 nm devem ser acima de 0,1 e a relação A260/A280 ideal deve estar entre 1,8 e 2,0, indicando que não há

contaminação significativa por proteínas, guanidina ou fenol residual, que podem inibir a transcrição reversa do RNA. A concentração de RNA foi estimada pela fórmula: $[RNA]_{\mu g/\mu L} = (A_{260} * f * 40) / 1000$, na qual f é o fator de diluição (Sambrook *et al.*, 1989).

2.4. Síntese da Primeira Fita de cDNA

A fita de cDNA inicial foi sintetizada pela enzima transcriptase reversa, a partir de RNA total, utilizando-se o kit *Super ScriptTM Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis*, da Gibco Life Technologies, que se baseia no protocolo de Sokolov e Prockop (1994). O método de iniciação da primeira fita de cDNA empregado foi o que utiliza o *primer* oligo-dT12-18, que parecia à cauda poli A+, presente na maioria dos mRNAs eucarióticos.

A transcrição reversa do mRNA poli-A+ foi realizada em reações de 20 μ L, contendo: 5 μ g de RNA total tratado com a enzima RQI DNase I (Promega); 0,5 μ g de *primers* oligo-dT12-18; deoxinucleosídeos trifosfatados (500 μ M de cada); $MgCl_2$ 2,5 mM; ditioneitol (DTT) 5 μ M; e 200 unidades de transcriptase reversa. Inicialmente, o *primer* e o RNA total sofreram uma desnaturação a 70°C por 10 min. Em seguida, foram acrescentados os demais componentes da reação, que foi mantida a 42°C por 50 min, para ocorrer a transcrição reversa, e depois a 70°C por 15 min, para a inativação da enzima. Finalmente, após adição de quatro unidades de Ribonuclease H, que degrada a fita de mRNA do híbrido cDNA:mRNA, as amostras foram incubadas a 37°C por 30 min e armazenadas a -20°C até o momento do seu uso.

2.5. Construção dos *Primers* Específicos

Primers específicos foram construídos a partir da seqüência de DNA genômico depositada no GenBank (No. de acesso AF195819), que codifica a IFS 2 de soja (Jung *et al.*, 2000). Para isso, foi utilizado o programa Primer3 Input Program, que está disponível no endereço eletrônico: http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primers3.html (Rozen e Skaletsky, 1998).

Os *primers* foram desenhados de tal forma a flanquear o único íntron presente no gene, de modo que a amplificação a partir do DNA genômico fornecesse um fragmento maior do que aquele obtido a partir da amplificação do cDNA.

2.6. Amplificação e Separação dos Fragmentos RT-PCR

A primeira fita de cDNA foi amplificada em uma mistura de reação de 25 μL contendo: 2 μL da solução de cDNA obtido a partir da transcrição reversa com primer oligo-dT; 1 unidade de Taq DNA polimerase; dNTP 200 μM de cada; MgCl_2 1,5 μM ; e 7,5 pmoles de cada um dos *primers* específicos. As reações de PCR foram realizadas em termociclador PE Applied Biosystems, modelo 9600. As condições de amplificação foram: um passo de 94 °C por 3 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 55 °C por 1 min e 72 °C por 1 min; e um passo final a 72 °C por 7 min.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM), corados com brometo de etídeo na concentração de 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e fotodocumentados sob luz ultravioleta, pelo sistema de Eagle Eye II (Stratagene).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Acúmulo de Isoflavonas Durante o Enchimento do Grão de Soja

Foram detectadas seis formas de isoflavonas ao longo do enchimento do grão de soja (daidzina, genistina, glicitina, malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina), tanto para a variedade comercial IAC-100 como para a linhagem BARC-8 cultivadas nas duas faixas de temperatura testadas. Os resultados mostrados nos Quadros 1 e 2 indicam o desenvolvimento da semente de soja da variedade IAC-100 e da linhagem BARC-8, bem como a síntese das diferentes formas de isoflavona. Um indicador da idade cronológica, dias após florescimento (DAF), está incluído nas tabelas. Para estimar tal parâmetro, foram observadas e anotadas as datas do início do florescimento e da coleta das sementes a cada estágio de desenvolvimento.

Além das seis formas de isoflavonas citadas acima, foram detectados traços das formas agliconas: daidzeína, genisteína e gliciteína. Kudou *et al.* (1991) e Tsukamoto *et al.* (1995) também verificaram o acúmulo das mesmas seis isoflavonas aqui encontradas ao longo do enchimento do grão de soja. No entanto, Wang e Murphy (1994) e Hocck *et al.* (2000) encontraram, além dessas formas, níveis mensuráveis das agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) e das formas acetilglicosiladas (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina).

Segundo Graham (1991), na semente de soja, as isoflavonas são armazenadas no vacúolo na forma de glicosil e malonil-glicosil conjugados. De acordo, com Griffith *et al.* (2001), as formas agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) e acetilglicosiladas (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina) resultam do processamento da soja e produtos da soja ou do preparo de amostras para análise.

Quadro 1 – Teores de daidzina (DAID), genistina (GEN), glicitina (GLI), malonildaidzina (MDAID), malonilgenistina (MGEN), malonilglicitina (MGLI) e isoflavonas totais (ISOF) ao longo de cinco estádios de desenvolvimento (ED) das sementes da variedade de soja IAC-100, cultivadas sob dois regimes de temperaturas.

| ED | MF | DAF | DAID | GEN | GLI | MDAID | MGEN | MGLI | ISOF |
|------------------------|----------------|-----|--------|--------|--------|---------|---------|--------|---------|
| 33 e 22 °C (dia/noite) | | | | | | | | | |
| 1 | 0 – 75 | 39 | 3,48 | 5,54 | 65,15 | 51,79 | 20,13 | 23,49 | 169,59 |
| 2 | 76 – 150 | 47 | 18,14 | 22,03 | 53,45 | 235,75 | 116,68 | 105,48 | 551,55 |
| 3 | 151 – 225 | 51 | 23,06 | 20,69 | 85,38 | 267,94 | 193,96 | 153,20 | 744,26 |
| 4 | 226 – 300 | 58 | 54,64 | 68,61 | 100,71 | 400,40 | 543,35 | 272,66 | 1440,38 |
| 5 | Semente madura | 78 | 148,78 | 161,06 | 169,89 | 966,23 | 1503,03 | 308,80 | 3257,81 |
| 28 e 13 °C (dia/noite) | | | | | | | | | |
| 1 | 0 – 75 | 42 | 5,89 | 9,86 | 80,49 | 71,83 | 25,09 | 15,69 | 208,87 |
| 2 | 76 – 150 | 47 | 43,85 | 24,97 | 59,89 | 337,44 | 123,69 | 51,32 | 641,18 |
| 3 | 151 – 225 | 52 | 66,54 | 39,29 | 98,82 | 528,32 | 281,68 | 203,15 | 1217,82 |
| 4 | 226 – 300 | 58 | 109,29 | 83,97 | 116,97 | 752,37 | 866,67 | 314,99 | 2244,28 |
| 5 | Semente madura | 78 | 225,82 | 327,23 | 161,23 | 1885,64 | 3564,1 | 389,75 | 6553,83 |

*Os resultados do teor de isoflavonas constituem a média de três repetições, expressos em µg/g de semente de soja.

MF – massa fresca em mg

DAF – dias após o florescimento.

Quadro 2 – Teores de daidzina (DAID), genistina (GEN), glicitina (GLI), malonildaidzina (MDAID), malonilgenistina (MGEN), malonilglicitina (MGLI) e isoflavonas totais (ISOF) ao longo de cinco estádios de desenvolvimento (ED) das sementes da linhagem de soja BARC-8, cultivadas sob dois regimes de temperaturas.

| ED | MF | DAF | DAID | GEN | GLI | MDAID | MGEN | MGLI | ISOF |
|------------------------|----------------|-----|-------|-------|--------|--------|---------|--------|---------|
| 33 e 22 °C (dia/noite) | | | | | | | | | |
| 1 | 0 – 75 | 38 | 0 | 0 | 53,72 | 0 | 22,73 | 0 | 76,45 |
| 2 | 76 – 150 | 42 | 0 | 0 | 39,69 | 56,13 | 43,32 | 66,02 | 205,15 |
| 3 | 151 – 225 | 49 | 4,51 | 7,18 | 34,56 | 42,17 | 64,04 | 118,03 | 270,51 |
| 4 | 226 – 300 | 53 | 4,25 | 8,50 | 33,32 | 45,18 | 122,18 | 124,58 | 338,03 |
| 5 | Semente madura | 78 | 12,50 | 38,42 | 58,11 | 118,79 | 371,90 | 197,79 | 797,53 |
| 28 e 13 °C (dia/noite) | | | | | | | | | |
| 1 | 0 – 75 | 40 | 7,59 | 10,72 | 68,35 | 71,34 | 41,70 | 19,46 | 219,18 |
| 2 | 76 – 150 | 45 | 29,38 | 20,34 | 40,29 | 224,86 | 130,11 | 72,78 | 517,79 |
| 3 | 151 – 225 | 51 | 22,93 | 18,99 | 71,26 | 237,20 | 175,27 | 131,55 | 657,22 |
| 4 | 226 – 300 | 57 | 27,74 | 35,57 | 88,86 | 262,83 | 445,35 | 276,62 | 1137,00 |
| 5 | Semente madura | 78 | 43,35 | 71,44 | 144,58 | 478,62 | 1144,26 | 454,37 | 2336,66 |

*Os resultados do teor de isoflavonas constituem a média de três repetições, expressos em µg/g de semente de soja.

MF – massa fresca em mg

DAF – dias após o florescimento.

Em ambas as condições de cultivo, a variedade comercial IAC-100 e a linhagem BARC-8 apresentaram teores de isoflavonas crescentes até o 5º estágio de desenvolvimento (semente madura). Verificou-se que do 4º para o 5º estágio houve um aumento superior a 100% no teor de isoflavonas para ambos os cultivares. Dados de massa seca, mostraram que no 4º estágio já havia um acúmulo superior a 90% tanto em IAC-100 como em BARC-8 (dados não mostrados). Portanto, não há uma relação do acúmulo de massa seca e de isoflavonas. Os dados indicam que a síntese de isoflavonas continua após o período de acúmulo de massa seca no grão.

Os resultados das análises de variância, por meio dos quais podem ser observados os efeitos da temperatura, genótipo e estágio de desenvolvimento da semente e suas interações sobre a composição de isoflavonas de soja, são mostrados no Quadro 3. Observou-se que houve variação significativa para teor de isoflavonas em função do genótipo, da temperatura e dos estágios de desenvolvimento. A análise de variância também indica ter havido interação entre os três fatores analisados, exceto para a característica malonildaidzina que não diferiu de forma significativa na interação genótipo x temperatura e genótipo x temperatura x estágio de desenvolvimento.

Os resultados das análises das médias pelo teste de Tukey (a 5% de probabilidade), da interação genótipo x temperatura para as características que foram significativas pela análise de variância, mostram que IAC-100 e BARC-8 diferem de forma significativa tanto na temperatura de cultivo a 33/22, como a 28/13 °C (dia/noite), exceto para malonilglicetina na temperatura mais baixa, na qual os dois genótipos não diferiram entre si (dados não mostrados). Enquanto que para a análise da interação temperatura x genótipo, observou-se que a característica glicetina não diferiu de forma significativa no genótipo IAC-100 cultivado nas temperaturas de 33/22 e 28/13 °C (dia/noite), ou seja, essa característica não foi influenciada pela temperatura nesse genótipo. As demais características foram contrastantes de forma significativa tanto em IAC-100 como em BARC-8 (dados não mostrados), ou seja, o teor de todas as outras isoflavonas foi influenciado pela temperatura contrastante nos dois genótipos.

Quadro 3 – Valores dos quadrados médios (QM), médias e coeficiente de variação experimental (CV %), obtidos das análises de variância do delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se a variedade IAC-100 e a linhagem Barc-8, com relação aos teores de daidzina (DAID), genistina (GEN), glicitina (GLI), malonildaizina (MDAID), malonilgenistina (MGEN), malonilglicitina (MGLI) e isoflavonas totais (ISOF).

| FV | GL | Quadrados Médios | | | | | | |
|---------|----|------------------|-----------|-----------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | DAID | GEN | GLI | MDAID | MGEN | MGLI | ISOF |
| G | 1 | 45096,96* | 45709,92* | 19359,19* | 1632267* | 4276332* | 21469,08* | 16462100* |
| T | 1 | 14726,17* | 14455,66* | 8409,64* | 1661273* | 1474059* | 46816,78* | 9318801* |
| ED | 4 | 18903,77* | 41104,15* | 12313,37* | 1765678* | 4204512* | 202765,8* | 17893340* |
| G*T | 1 | 1283,41* | 1637,26* | 3426,29* | 65,81 ^{ns} | 504214* | 17144,11* | 346668,3* |
| G*ED | 4 | 11989,15* | 17983,47* | 1427,88* | 239629,3* | 2467944* | 3833,42* | 5403982* |
| T*ED | 4 | 968,68* | 4481,63* | 648,86* | 435519* | 572963,8* | 17939,16* | 2711061* |
| G*T*ED | 4 | 380,10* | 3013,79* | 1237,45* | 5797,07 ^{ns} | 603808,6* | 4849,09* | 504876,2* |
| Resíduo | 40 | 80,73 | 156,79 | 145,13 | 3260,01 | 9130,40 | 551,60 | 29509,44 |
| Média | | 42,57 | 48,72 | 81,23 | 384,83 | 456,87 | 165,03 | 1179,28 |
| CV(%) | | 21,10 | 25,70 | 14,83 | 14,84 | 20,91 | 14,23 | 14,57 |

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

^{ns} Não significativo.

São apresentadas, no Quadro 4, as médias da interação genótipo x estágio de desenvolvimento do grão de soja, para as diferentes formas de isoflavonas. Os resultados mostram que a partir do segundo estágio de desenvolvimento já ocorre um acúmulo diferenciado, de forma significativa, para a maioria das isoflavonas entre os dois genótipos. O acúmulo de genistina e malonilglicetina só diferiu de forma significativa a partir do terceiro estágio, enquanto, malonilgenistina só a partir do quarto estágio. Kudou *et al.* (1991) verificaram que genistina e malonilgenistina acumulam muito mais no final do período de enchimento do grão de soja, enquanto que daidzina e malonildaidzina acumulam com uma taxa constante ao longo do desenvolvimento do grão.

Quadro 4 – Valores das médias da interação genótipo x estágio de desenvolvimento (ED) da semente de soja, obtidas para os teores de daidzina (DAID), genistina (GEN), glicetina (GLI), malonildaidzina (MDAID), malonilgenistina (MGEN), malonilglicetina (MGLI) e isoflavonas totais (ISOF).

| | | ED 1 | ED 2 | ED 3 | ED 4 | ED 5 |
|-------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|
| DAID | IAC-100 | 4,88A | 31,00A | 44,00A | 81,97A | 187,30A |
| | BARC-8 | 3,80A | 14,69B | 13,56B | 15,83B | 27,93B |
| GEN | IAC-100 | 7,67A | 23,50A | 29,99A | 76,29A | 244,15A |
| | BARC-8 | 5,36A | 10,17A | 13,09B | 22,04B | 54,93B |
| GLI | IAC-100 | 72,82A | 56,68A | 92,10A | 108,84A | 165,57A |
| | BARC-8 | 61,03A | 39,99B | 52,91B | 61,09B | 101,35B |
| MDAID | IAC-100 | 61,82A | 286,60A | 398,14A | 576,39A | 1425,94A |
| | BARC-8 | 20,85A | 93,12B | 108,72B | 245,27B | 631,53B |
| MGEN | IAC-100 | 22,61A | 120,19A | 237,83A | 705,01A | 2533,58A |
| | BARC-8 | 47,04A | 134,09A | 150,62A | 192,51B | 425,27B |
| MGLI | IAC-100 | 20,08A | 78,40A | 178,18A | 293,83A | 349,28A |
| | BARC-8 | 9,73A | 69,40A | 124,80B | 200,60B | 326,09A |
| ISOF | IAC-100 | 189,88A | 596,37A | 981,05A | 1842,33A | 4905,82A |
| | BARC-8 | 147,82A | 361,47B | 463,70B | 737,34B | 1567,1B |

Médias na coluna seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

São apresentadas, no Quadro 5, as médias da interação temperatura x estágio de desenvolvimento do grão de soja, para as diferentes formas de isoflavonas. Os resultados mostram que a partir do segundo estágio de desenvolvimento já ocorre um acúmulo diferenciado, de forma significativa, para daidzina, malonildaidzina e isoflavonas totais entre os dois regimes de temperatura analisado. O acúmulo de genistina, malonilgenistina, glicitina e malonilglicitina só diferiu de forma significativa a partir do terceiro estágio.

Quadro 5 – Valores das médias da interação temperatura x estágio de desenvolvimento (ED) da semente de soja, obtidas para os teores de daidzina (DAID), genistina (GEN), glicitina (GLI), malonildaidzina (MDAID), malonilgenistina (MGEN), malonilglicitina (MGLI) e isoflavonas totais (ISOF).

| | | ED 1 | ED 2 | ED 3 | ED 4 | ED 5 |
|-------|----------|---------|---------|---------|----------|----------|
| DAID | 28/13 °C | 6,74A | 36,62A | 44,74A | 68,52A | 134,59A |
| | 33/22 °C | 1,93A | 9,07B | 13,62B | 29,28B | 80,64B |
| GEN | 28/13 °C | 10,29A | 22,66A | 29,14A | 59,77A | 199,34A |
| | 33/22 °C | 2,74A | 11,02A | 13,94B | 38,56B | 99,74B |
| GLI | 28/13 °C | 74,42A | 50,10A | 85,04A | 102,92A | 152,91A |
| | 33/22 °C | 59,43B | 46,57A | 59,97B | 67,02B | 114,00B |
| MDAID | 28/13 °C | 56,77A | 233,78A | 351,80A | 598,87A | 1514,96A |
| | 33/22 °C | 25,9A | 145,94B | 155,06B | 222,79B | 542,52B |
| MGEN | 28/13 °C | 48,22A | 174,28A | 259,44A | 564,76A | 2021,38A |
| | 33/22 °C | 21,43A | 80,00A | 129,01B | 332,77B | 937,47B |
| MGLI | 28/13 °C | 17,58A | 62,05A | 167,32A | 295,81A | 422,07A |
| | 33/22 °C | 12,23A | 85,75A | 135,62B | 198,62B | 253,30B |
| ISOF | 28/13 °C | 214,03A | 579,49A | 937,53A | 1690,64A | 4445,25A |
| | 33/22 °C | 123,67A | 378,36B | 507,22B | 889,03B | 2027,67B |

Médias na coluna seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Dados da literatura mostram que os teores e a composição de isoflavonas são influenciados pelo genótipo e pelas condições ambientais durante o cultivo (Eldridge e Kwolek, 1983; Wang e Murphy, 1994; Carrão-

Panizzi e Kitamura, 1995; Carrão-Panizzi, 1996; Choi et al., 1996; Aussenac et al., 1998; Carrão-Panizzi et al., 1999; Hocck et al., 2000; Lee et al., 2002). Foi observado por Tsukamoto *et al.* (1995), em variedades de soja crescidas a temperaturas mais altas, redução dos teores de isoflavonas de 14 a 16 vezes na semente. Essa diferença tão pronunciada deve ter sido decorrente do regime de temperatura mais contrastante utilizado, que foi de 38/28 e 25/10 °C (dia/noite). Apesar de estar estabelecido que a temperatura influencia os teores de isoflavonas em sementes de soja, não há dados que expliquem como ocorre essa influência em torno do caráter.

3.2. Expressão do Gene que Codifica a IFS Durante o Enchimento do Grão de Soja

Após verificar que ocorreu aumento no teor de isoflavonas ao longo do enchimento do grão de soja, e também que a temperatura influencia o acúmulo destes compostos, tornou-se importante saber o padrão de expressão do gene que codifica a enzima chave para síntese de isoflavonas. Uma vez que a expressão da maioria dos genes é controlada em nível transcricional, foi avaliada a cinética de acúmulo do RNA de IFS pela técnica de RT-PCR.

O par de *primers* desenhado com base na seqüência do gene da IFS2, disponível no GenBank, foi testado com DNA genômico e os dois genes da IFS de soja foram amplificados, gerando dois fragmentos (Figura 1). O fragmento correspondente ao gene da IFS2 tem tamanho de 842 pb, e da IFS1 de 925 pb. A diferença do fragmento amplificado é devido a presença de *íntrons* de tamanhos diferentes nestes dois genes.

A técnica de RT-PCR foi realizada utilizando o par de *primers* desenhado que amplifica uma região presente nos dois genes que codificam a IFS. O fragmento gerado foi do tamanho esperado, de 707 pb, demonstrando a eficiência dos *primers* construídos e das condições empregadas para amplificação dos cDNAs. Entretanto, não foi possível diferenciar os fragmentos referentes a cada gene de IFS, porque ambos possuíam o mesmo tamanho, devido ao processamento do RNA e a retirada dos *íntrons*.

A cinética de acúmulo dos transcritos da IFS, por RT-PCR, ao longo do enchimento do grão da variedade IAC-100 (Figura 1 A) e da linhagem BARC-8

(Figura 1 B) crescidas nas temperaturas de 33/22 e 28/13 °C (dia/noite), mostra que não houve diferença no padrão de expressão gênica da IFS em função do estágio de desenvolvimento do grão, nem da temperatura ao longo do enchimento. Portanto, não há uma relação entre o acúmulo de isoflavonas e a quantidade de transcritos para IFS durante o enchimento do grão.

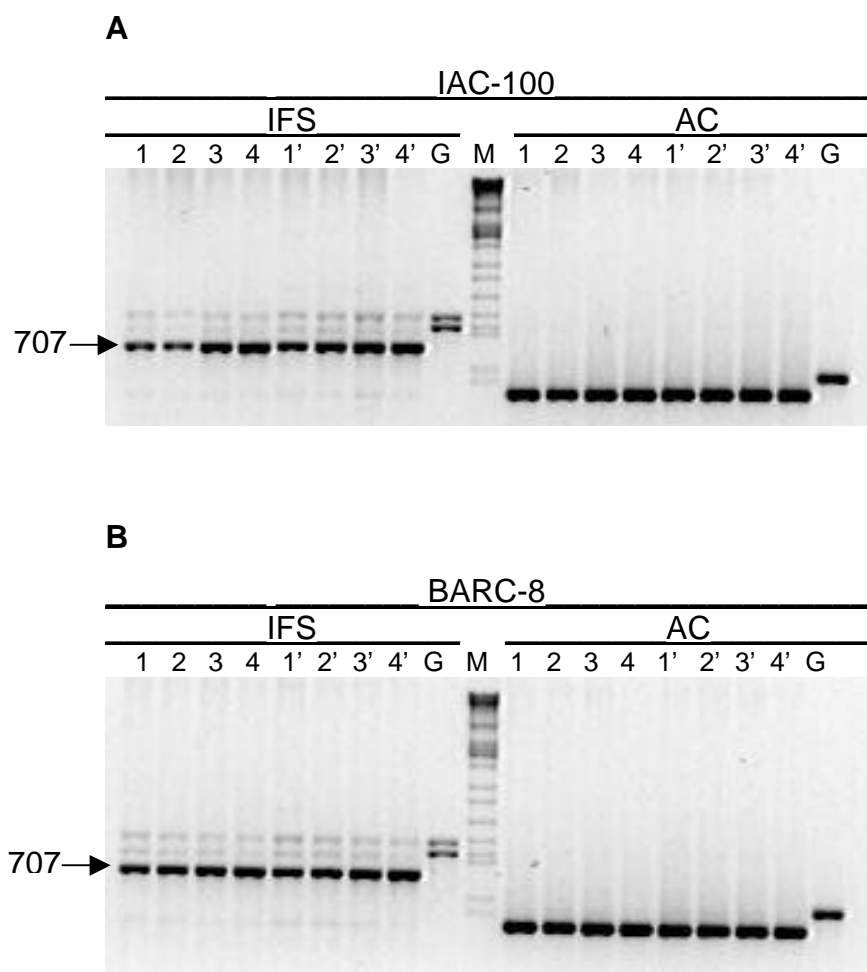


Figura 1 – Amplificação do cDNA da sintase de isoflavona (IFS) e actina (AC) pela técnica de RT-PCR. Em ambas as figuras, os números de 1 a 4 correspondem ao cDNA dos estádios de desenvolvimento das sementes de soja cultivadas em alta temperatura (33/22 °C - dia/noite); e de 1' a 4', cultivadas em baixa temperatura (28/13 °C - dia/noite), tanto para a variedade IAC-100 como para a linhagem BARC-8. G – amplificação a partir do DNA genômico; M – corresponde ao marcador de tamanho molecular (DNA de λ clivado com *EcoR* I, *Hind* III e *BamH* I).

Apesar da técnica de RT-PCR ter alta sensibilidade, que permite a detecção de cDNAs correspondentes a mRNAs com baixo número de cópias, ela é tida como uma técnica qualitativa. O gene de actina tem expressão constitutiva e foi utilizado como um controle interno (Figura 1) As quantidades de RNA total utilizadas estavam padronizadas, uma vez que não se detecta diferenças nas intensidades das bandas correspondentes ao gene de actina. Entretanto, será necessário fazer uma análise quantitativa, para poder inferir como se comporta a expressão da IFS ao longo do enchimento do grão e se ocorre influência da temperatura.

Dados da literatura mostram a forte influência que a temperatura tem sobre os níveis de isoflavonas, contudo, não há nenhum relato de como se comporta a enzima IFS quando as plantas são cultivadas em diferentes regimes de temperatura. O conteúdo das isoflavonas também é aumentado em decorrência de estresses bióticos causados por microrganismos. Os autores Steele *et al.* (1999), trabalhando com suspensão de células de alfafa, submetidas a tratamento com elicitores, tiveram um aumento pronunciado no número de transcritos do gene da sintase de isoflavona presente nesta leguminosa. Foi verificado também em plantas de alfafa superexpressando a enzima isoflavona O-metiltransferase, que converte daidzeína em 7-O-metil daidzeína (fitoalexina), aumento dos transcritos da IFS, quando estas foram infectadas com patógeno, e também no controle quando infectado, porém em menor intensidade (He e Dixon, 2000).

Apesar da soja ser a leguminosa que apresenta as maiores quantidades de isoflavonas, praticamente não há dados relacionando o controle da expressão dos genes da IFS com os diferentes fatores que influenciam no teor de isoflavonas. Apenas os autores Yu *et al.* (2003) verificaram que sementes de soja expressando fatores de transcrição provenientes de milho, aumentaram os teores de isoflavonas nestas sementes, entretanto, os níveis dos transcritos dos genes da IFS foram similares no controle, bem como a quantidade da proteína. Os autores sugerem que, em decorrência do aumento na expressão de outros genes da via dos fenilpropanóides, houve aumento no fluxo de intermediários na via, refletindo no acúmulo dos substratos naringenina e liquiritigenina, e incremento na síntese de isoflavonas.

4. CONCLUSÕES

Foram detectadas seis formas de isoflavonas ao longo do enchimento do grão de soja (daidzina, genistina, glicitina, malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina), tanto para a variedade comercial IAC-100 como para a linhagem BARC-8 cultivadas nos dois regimes de temperatura adotados.

Os dados obtidos não mostram uma relação entre o acúmulo de massa seca e de isoflavonas. Os dados indicam que a síntese de isoflavonas continua após o período de acúmulo de massa seca no grão.

Os teores das isoflavonas avaliadas variaram em função do genótipo, da temperatura e dos estádios de desenvolvimento, e também em função da interação entre os três fatores analisados, exceto para a característica malonildaidzina, que não diferiu de forma significativa na interação genótipo x temperatura.

A baixa temperatura provocou aumento no teor de todas as isoflavonas analisadas e este aumento, ao longo do enchimento do grão, ocorreu tanto para a variedade IAC-100 como para a linhagem BARC-8. A única exceção foi a glicitina, cujo acúmulo não foi influenciado pela temperatura na variedade IAC-100.

Os teores das isoflavonas avaliadas, exceto malonilglicitina, diferiram entre os dois genótipos cultivados nas duas faixas de temperatura.

Não foi observada relação entre o acúmulo de isoflavonas e a quantidade de transcritos para IFS durante o enchimento do grão. Isso indica que a regulação desse gene não ocorre em nível transcricional. Estudos posteriores deverão ser conduzidos, visando fazer uma análise quantitativa, para poder inferir, de um modo mais preciso, como ocorre a expressão da IFS ao longo do enchimento do grão e se ocorre influência da temperatura.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aussenac, T.; Lacombe, S.; Daydé, J. Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds: effects of variety and environment. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68 (suppl.), p. 1480S-1485S, 1998.
- Carrão-Panizzi, M. Avaliação de cultivares de soja quanto aos teores de isoflavonóides. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 691-698, 1996.
- Carrão-panizzi, M.; Kitamura, K. Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. **Breeding Science**, v. 45, n. 3, p. 295-300, 1995.
- Carrão-Panizzi, M.; Beléia, A. D. P.; Prudêncio-Ferreira, S. H.; Oliveira, M. C. N.; Kitamura, K. Effects of isoflavones on beany flavor and astringency of soymilk and cooked whole soybean grains. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 6, p. 1045-1052, 1999.
- Chiari, L. **Herança do teor de isoflavonas em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Viçosa, MG, UFV, 2003. 65p. (Tese D. S.)
- Choi, J. S. C.; Kwon, T. W.; Kim, J. S. Isoflavone contents in some varieties of soybean. **Foods Biotechnology**, v. 5, p. 167-169, 1996.
- Eldridge, A. C.; Kwolek, W. F. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, p. 394-396, 1983.
- Graham, T. L., Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. **Plant Physiology**, v. 95, p. 594-603, 1991.
- Griffith, A. P.; Collison, M. W. Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 913, p. 397-413, 2001.
- He, X-Z.; Dixon, R. A.; Genetic manipulation of isoflavone 7-O-methyltransferase enhances biosynthesis of 4'-O-methylated isoflavonoid phytoalexins and disease resistance in alfalfa. **The Plant Cell**, v. 12, p. 1689-1702, 2000.
- Hocck, J. A.; Fehr, W. R.; Murphy, P. A.; Welke, G. A. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. **Crop Science**, v. 40, p. 48-51, 2000.

- Jung, W.; Yu, O.; Lau, S-M. C.; O'Keefe, D. P.; Odell, J.; Fader, G.; McGonigle, B. Identification and expression of isoflavone synthase, the enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 208-212, 2000.
- Kitamura, K., Igita, K., Kikuchi, A., Kudou, S., Okudo, K. Low isoflavone content in early maturing cultivars, so called Summer-type soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill). **Japanese Journal of Breeding**, v. 41, p. 651-654, 1991.
- Kudou, S.; Fleury, Y.; Weltl, D.; Magnolato, D.; Uchida, T.; Kitamura, K.; Okudo, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). **Agricultural and Biological Chemistry**, v.55, n.9, p.2227-2233, 1991.
- Lee, S. J.; Yan, W.; Ahn J. K.; Chung, M. Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. **Field Crops Research**, v. 4150, p. 1-12, 2002
- Leffel, R.C. Registration of high-protein soybean germplasm lines BARC-6, BARC-7, BARC-8 and BARC-9. **Crop Science**, v. 32, p. 502, 1992.
- Messina, M. Soyfoods and soybean phyto-oestrogens (isoflavones) as possible alternatives to hormone replacement therapy (HRT). **European Journal of Cancer**, v. 36, p. S71-S77, 2000.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. Software: Primer3, 1998. http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primers3.htm
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory. 1989.
- Setchell, K. D. R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 6 (Suppl.), p. 1333S-1346S, 1998.
- Sokolov, B. P., Prockop, D. J. A rapid and simple PCR-based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4009-4015, 1994.
- Steele, C. L.; Gijzen, M.; Qutob, D.; Dixon, R. A. Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 367, n. 1, p. 146-150, 1999.
- Tsukamoto, C.; Shimada, S.; Igita, K.; Kudou, S.; Kokubun, M.; Okubo, K.; Kitamura, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1184-1192, 1995.

- Wang, H. J.; Murphy, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1674-1677, 1994.
- Yu, O.; Jung, W.; Shi, J.; Croes, R. A.; Fader, G. M.; McGonigle, B.; Odell, J. T. Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. **Plant Physiology**, v. 124, p. 781-793, 2000.
- Yu, O.; Shi, J.; Hession, A. O.; Maxwell, C. A.; McGonigle, B.; Odell, J. T. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. **Phytochemistry**, v.63, p. 753-763, 2003.

CAPÍTULO 2

MAPEAMENTO DE LOCOS QUE CONTROLAM O CONTEÚDO DE ISOFLAVONAS EM SOJA

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja, nos últimos anos, vem crescendo em vários países, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical, como é o caso do Brasil. Essa expansão se deve, principalmente, ao desenvolvimento de variedades melhoradas, adaptadas ao cultivo em variadas condições de plantio. É uma cultura de grande interesse mundial devido à excelente combinação que apresenta entre produtividade, normalmente acima de duas toneladas por hectare, e teores de proteína e óleo no grão, em torno de 40% e 20%, respectivamente. Essa combinação contribuiu para a formação de um vasto complexo agro-industrial destinado ao processamento dos produtos derivados da soja.

Atualmente a soja vem tendo destaque também por possuir diversos componentes biologicamente ativos, estando entre os alimentos funcionais mais estudados. Dentre estes compostos destacam-se as isoflavonas que são referidas como fitoestrógenos, pois parecem ter efeitos moduladores dos receptores estrogênicos. Os efeitos benéficos associados ao consumo de isoflavonas incluem a atenuação dos sintomas da menopausa (Kurzer, 2000), prevenção e tratamento da osteoporose (Erdman e Potter, 1997), melhora dos níveis de colesterol do sangue (Nilausen e Meinertz, 1999) e diminuição do risco de certos tipos de câncer (Barnes *et al.*, 1999) e de doenças cardiovasculares (Tikkanen *et al.*, 1998).

A soja é uma fonte rica e quase única de isoflavonas na dieta humana. Os teores de isoflavonas, nas sementes de soja, apresentam grande variabilidade devido a fatores genéticos e ambientais, tais como temperatura, local e ano de plantio. As isoflavonas mais conhecidas e estudadas até agora são: genistina, daidzina, glicitina, genisteína, daidzeína, gliciteína, 6"-O-

acetilgenistina, 6"-O-acetildaidzina, 6"-O-acetilglucitina, 6"-O-malonilgenistina, 6"-O-malonildaidzina e 6"-O-malonilglucitina (Wang e Murphy, 1994).

Os programas de melhoramento genético da soja têm dado maior ênfase à produtividade, resistência a doenças e adaptabilidade. Os programas que visam ao desenvolvimento de cultivares de melhor qualidade nutricional têm se concentrado no aumento do teor de proteínas, na alteração da composição da fração óleo e na diminuição de fatores antinutricionais das sementes. O teor de isoflavonas não tem merecido grande atenção por parte dos melhoristas até o presente, uma vez que as informações sobre esta característica são raras e pouco conclusivas.

Os avanços das técnicas de biologia molecular têm permitido a identificação de marcadores genéticos que são fundamentais para o monitoramento dos fatores genéticos que determinam um caráter, o qual muitas vezes é avaliado por processos analíticos onerosos e demorados. Marcadores genéticos ligados a genes que controlam o teor de isoflavonas podem ser usados para seleção indireta de alelos favoráveis, de forma mais eficiente que a seleção fenotípica direta, que utiliza a análise por HPLC, uma técnica demorada e trabalhosa.

A seleção de características agrônômicas monitorada por marcadores moleculares baseia-se no princípio de que se um gene, ou um grupo de genes, encontra-se ligado a um marcador genético de fácil identificação, esse marcador pode ser utilizado para selecionar a característica de interesse em um programa de melhoramento. Segundo Hayward *et al.* (1994), o método mais eficaz de determinar esse tipo de associação envolve a construção de mapas genéticos detalhados, nos quais podem ser localizadas regiões contendo locos para características quantitativas (QTLs).

Com o propósito de identificar marcadores que estão ligados a locos que controlam a variação do teor das isoflavonas agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), Meksem *et al.* (2001) avaliaram 100 linhagens recombinantes endogâmicas (RIL) do cruzamento entre duas variedades que contrastavam para o conteúdo dessas isoflavonas. Encontraram quatro regiões genômicas que contêm QTLs para teor de isoflavonas em sementes de soja, sendo dois QTLs para daidzeína e dois QTLs para gliciteína.

A característica “teor de isoflavonas” ainda é pouco entendida do ponto de vista genético. Por esse motivo o presente trabalho teve como objetivos, mapear e identificar marcadores do tipo microssatélites e RAPD ligados a QTLs associados à determinação do conteúdo de isoflavonas em sementes de soja. Foi utilizada uma progênie F_2 obtida do cruzamento entre dois progenitores contrastantes para o teor de isoflavonas, IAC-100 e BARC-8.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Genético e Cruzamentos

Foi utilizado uma população de 93 plantas F_2 , obtida do cruzamento entre dois progenitores contrastantes para teor de isoflavonas e proteínas. A linhagem BARC-8, com baixo teor de isoflavonas (Chiari, 2003) e elevado teor protéico, desenvolvida pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA-ARS, Beltsville, MD) (Leffel, 1992) foi cruzada com a variedade comercial IAC-100, desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Campinas, a qual apresenta alto teor de isoflavonas, conforme descrito por Carrão-Panizzi e Kitamura (1995) e teor normal de proteínas. Este cultivar foi usado como progenitor feminino.

As plantas F_2 foram cultivadas em casa de vegetação do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, em dezembro de 2000, em vasos contendo três litros de solo previamente adubado, cultivando-se duas plantas por vaso.

Em decorrência da influência do progenitor materno, tanto devido ao efeito materno quanto ao efeito citoplasmático, nos teores das isoflavonas (Chiari, 2003), torna-se ineficiente a seleção em sementes F_2 . Uma medida das médias das plantas F_2 seria o mais indicado para fazer tal estimativa (Singh e Hadley, 1972). Portanto, em dezembro de 2001, as sementes F_2 foram plantadas para a obtenção das sementes F_3 , juntamente com os progenitores BARC-8 e IAC-100.

2.2. Extração e Quantificação das Isoflavonas de Sementes de Soja

De cada planta F_2 tomou-se uma amostra de vinte sementes que foram moídas e sub-amostras de 500 mg foram utilizadas para extração em 10 mL de metanol 80% em tubos de centrífuga com tampa. Os tubos foram mantidos por 1h no gelo, com agitação a cada 15 min em agitador mecânico do tipo vórtex. Após centrifugação a 10.144 g por 5 min, sob refrigeração, os extratos foram filtrados em membrana PTFE (0,45 μm) e 20 μL do filtrado foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A análise foi realizada em cromatógrafo SHIMADZU, série LC10, coluna Shim-pack CLC-ODS(M) (4,6 x 250 mm, SHIMADZU), mantida a 40°C. A eluição foi realizada a um fluxo de 1,0 mL/min, em sistema gradiente de acetonitrila, utilizando duas soluções: A) ácido acético 0,1% em água Milli-Q e B) ácido acético 0,1% em acetonitrila. O sistema gradiente de eluição iniciou com 15% da solução B mantida por 1 min, elevando-se gradativamente para 24% em 23 min, depois para 29% em 16 min, 35% em 4 min e 65% em 20 min, manteve-se assim por 1 min. E por fim, elevou-se para 80%, gradativamente, durante 5 min, para a lavagem da coluna, retornando para 15% em 10 min, totalizando 80 min. A detecção dos compostos foi realizada por meio de detector espectrofotométrico a 260 nm e a identificação, por comparação com os tempos de retenção dos padrões.

A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa. Os padrões de daidzeína, genisteína e genistina foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA) e os de gliciteína, glicitina, daidzina, 6"-O-acetilgenistina, 6"-O-acetildaidzina, 6"-O-acetilglicitina, 6"-O-malonilgenistina, 6"-O-malonildaidzina, 6"-O-malonilglicitina, da FUJICCO CO. LTD (Tóquio, Japão).

Os resultados foram expressos em µg de isoflavona por g de soja, com base na matéria seca, constituindo a média de duas repetições.

2.3. Análise do Teor de Proteína

Das mesmas amostras de vinte sementes utilizadas para quantificar os teores das isoflavonas, foram retiradas sub-amostras de 300 mg para a determinação do teor de proteína das 93 plantas F₂ e de sete plantas de cada progenitor (IAC-100 e BARC-8).

A determinação de proteínas foi efetuada segundo o método Kjeldahl (AOAC, 1975), com modificações. Na fase de digestão, após obtenção do material aparentemente digerido, adicionou-se peróxido de hidrogênio 30% e a mistura foi aquecida por mais 30 min. Na fase de destilação, a amônia liberada foi recolhida em solução de ácido bórico 4%. Obteve-se o teor de nitrogênio pela titulação da amônia com ácido clorídrico 0,05%. A partir do teor de nitrogênio, foi calculada a porcentagem de proteínas totais da amostra, empregando-se o fator de 6,25.

Os resultados dos teores de proteína foram expressos em porcentagem, com base na matéria fresca, constituindo a média de duas repetições.

2.4. Extração de DNA

Das mesmas amostras de vinte sementes utilizadas para quantificar os teores das isoflavonas e proteína, foram retiradas sub-amostras de 50 mg para a extração do DNA das 93 plantas F₂ e de cada progenitor (IAC-100 e BARC-8). A extração do DNA foi feita com base no protocolo descrito por McDonald *et al.* (1994), com algumas modificações. As amostras foram extraídas em microtubos de 1,5 mL contendo 1000 µL de tampão de extração, constituído de Tris-HCl 0,2 M (pH 8,0), NaCl 0,28 M, EDTA 25 mM (pH 8,0) e SDS 10%. As amostras foram, então, agitadas por 1 min em agitador mecânico do tipo vórtex e, em seguida, centrifugadas por 10 min por 14.000 rpm em microcentrífuga Eppendorf modelo 5415. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, sendo a eles acrescentados 10 µL de proteinase K 10mg/mL e 10 µL de CaCl₂ 1 mM. Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a 55 °C por 30 min. Foram, então, adicionados às amostras 900 µL de isopropanol e deixadas em repouso por 2 min. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 14.000 rpm na mesma centrífuga utilizada anteriormente. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram secos por 15 min à temperatura ambiente e ressuspensos em TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), seguindo-se um tratamento com RNase A, na concentração final de 60 µg/mL a 37 °C, por 90 min. O DNA foi recuperado por precipitação, mediante a adição de 900 µL de isopropanol, seguido de centrifugação por 10 min a 14.000 rpm. Após secagem do precipitado, à temperatura ambiente, o DNA foi ressuspensado em 300 µL de TE. A concentração do DNA foi estimada espectrofotometricamente por leitura da absorbância em 260 nm, sendo cada unidade de absorbância correspondente a 50 µg/mL de DNA fita dupla (Sambrook *et al.*, 1989).

2.5. Amplificação e Análise do DNA pela Técnica de Microssatélites

As reações de amplificação de microssatélites foram feitas em um volume total de 15 μL , contendo 12,5 μM de Tris-HCl (pH 8,3), 62,5 μM de KCl, 2,5 mM de MgCl_2 , 125 μM de cada um dos deoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,6 μM de cada *primer* ("Research Genetics", Huntsville, EUA), uma unidade da enzima Taq-polimerase e 18 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em Termociclador Perkin Elmer 9600 programado para uma etapa inicial de 7 min a 72 °C, seguida de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C e 2 min a 72 °C e, ao final dos 30 ciclos, uma etapa de 7 min a 72 °C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida 10%, contendo TAE 1X (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM, pH 7,0), a 120 V, por 4 horas. Terminada a corrida, os géis foram corados com solução de brometo de etídio (0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e fotodocumentados sob luz ultravioleta, pelo sistema de Eagle Eye II (Stratagene). O gel possuía 16,5x12,5 cm e espessura de 0,5 mm.

2.6. Amplificação do DNA pela Técnica de RAPD

Amostras de DNA foram amplificadas pela técnica de RAPD, de acordo com Williams *et al.* (1990), com *primers* decâmeros ("Operon Technologies", Alameda, CA, EUA), em termociclador Perkin-Elmer, modelo 9600.

As condições de amplificação foram as seguintes: uma etapa de desnaturação do DNA (94°C por 15 s), uma etapa de pareamento do *primer* ao DNA-molde (35°C por 30 s) e uma etapa de extensão do fragmento (72°C por 1 min). Após 40 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a 72°C, por sete min. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo 10 mg/ml de brometo de etídio, imerso em tampão TBE (tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotodocumentadas com o sistema Eagle Eye II (Stratagene).

2.7. Construção do Mapa de Ligação Genética

Os marcadores microssatélites foram codificados como homozigotos para os alelos vindos de IAC-100 (A), homozigotos para os alelos vindos de BARC-8 (B), heterozigotos (H) e falhas (-) das bandas amplificadas em cada um dos 93 indivíduos da população F₂.

Os marcadores RAPD foram codificados como homozigotos para os alelos vindos de IAC-100 (A), homozigotos para os alelos vindos de BARC-8 (B), não homozigoto para os alelos vindos de IAC-100 (C), não homozigoto para os alelos vindos de BARC-8 (D) e falhas (-) das bandas amplificadas em cada um dos 93 indivíduos da população F₂.

A segregação de cada fragmento polimórfico foi testada na população por meio do teste de qui-quadrado. Apenas os fragmentos da amplificação com microssatélites, cuja segregação se ajustou à proporção esperada de 1:2:1 ($P < 0,05$) foram utilizados nas análises posteriores. O mesmo foi feito para os fragmentos amplificados com RAPD, entretanto a proporção esperada foi de 3:1.

O mapeamento dos microssatélites e dos RAPD e o estabelecimento dos grupos de ligação foram feitos com a utilização do programa MAPMARKER (Lincoln *et al.*, 1993). Os marcadores foram agrupados, utilizando-se LOD mínimo de 4,0 e frequência máxima de recombinação de 0,30. A distância de mapeamento de Kosambi foi utilizada para a conversão da frequência de recombinação para centiMorgans (cM).

2.8. Identificação e Mapeamento de QTLs

2.8.1. Análise de Marca Simples

A análise de variância foi realizada para os dados fenotípicos e a associação entre marcadores individuais e teor de isoflavonas foi testado pela análise de marca simples, utilizando o programa GQMol (Cruz e Schuster, 2000), com um nível de significância de $P < 0,05$, na tentativa de detectar QTLs. A análise de regressão linear também foi realizada com o intuito de comprovação dos resultados da ANOVA e, adicionalmente, para a

determinação do R^2 , que neste caso é interpretado como o percentual da variação fenotípica explicado pelo marcador. Este procedimento permite a avaliação de todos os marcadores em relação à característica fenotípica, inclusive aqueles que não agruparam no mapa de ligação.

Os marcadores associados significativamente com teor de isoflavonas e com proteínas foram analisados por modelos de regressão múltipla, utilizando-se o procedimento de eliminação “Stepwise”, utilizando o programa GQMOL.

2.8.2. Mapeamento por Intervalo Composto

Para melhor precisão das estimativas de número e posição do QTL, e confirmação dos resultados da análise de marca simples, os marcadores que agruparam nos respectivos grupos de ligações, foram avaliados em um modelo de mapeamento por intervalo composto. O programa utilizado neste procedimento foi o QTL Cartographer versão 2.0 (Basten *et al.*, 2002). Foi estabelecido o modelo 6 e um *background* de 10 parâmetros baseados na análise de regressão *forward-backward* e uma precisão de 0.5 cM de *walking speed*. Para determinar um valor empírico de significância na detecção de QTLs, foi utilizado um teste de permutação, com 1.000 permutações e um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Detecção de Polimorfismos e Seleção dos *Primers* de Microssatélites e RAPD.

Os *primers* de microssatélites foram, inicialmente, testados nos progenitores com a finalidade de selecionar aqueles que produzissem fragmentos polimórficos e que, conseqüentemente, pudessem ser utilizados para mapeamento na população segregante.

Foram testados 445 pares de *primers* de microssatélites (“Research Genetics”, Huntsville, AL, EUA). Desse total, 101 exibiram polimorfismo nos progenitores, mas somente 98 apresentaram fragmentos polimórficos na população segregante. A segregação dos marcadores foi testada por meio do teste Qui-quadrado ($P < 0,05$), e, dos 98 *primers*, 90 apresentaram fragmentos polimórficos, que segregaram de acordo com o esperado em uma população F_2 , sendo a proporção 1:2:1. Na Figura 1 estão representados os produtos de amplificação gerados com o par de *primers* Satt552 nos progenitores IAC-100 e BARC-8 e em parte da população F_2 .

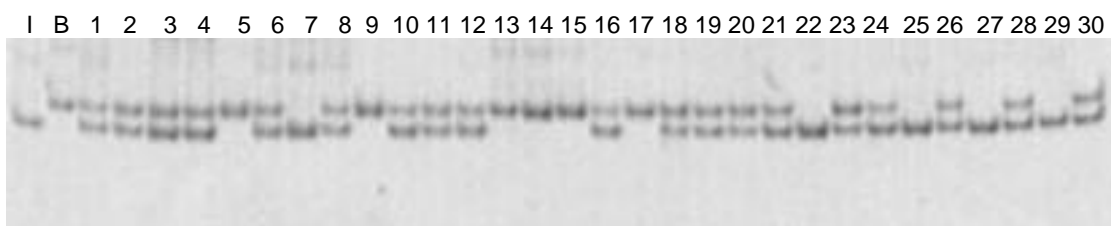


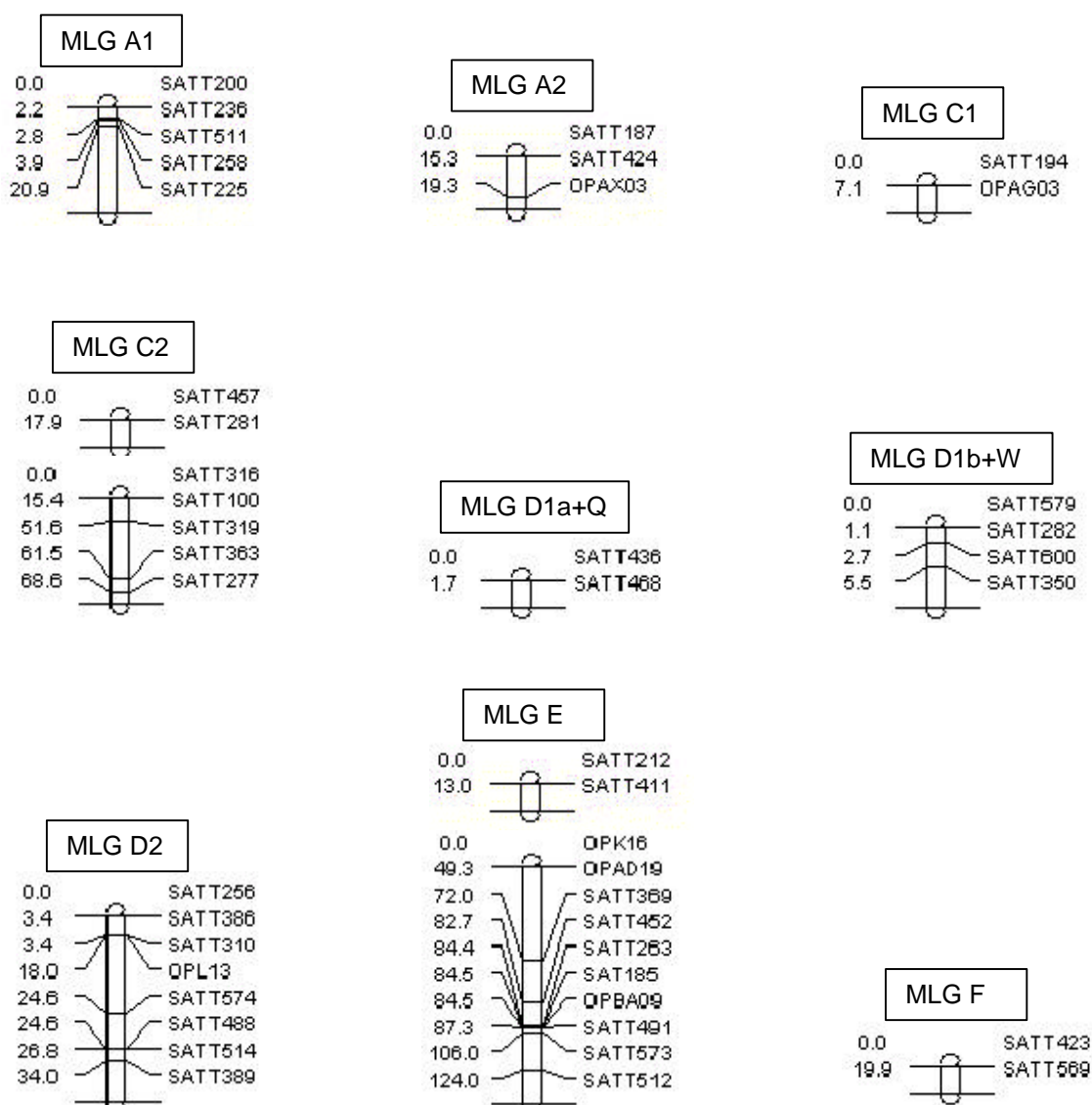
Figura 1 – Gel de poli-acrilamida 10% apresentando fragmentos polimórficos amplificados com o par de *primers* do microssatélite Satt552 nos pais IAC-100 (I) e BARC-8 (B) e em parte da população segregante (1 a 30).

No caso dos marcadores RAPD, foram testados 670 *primers*, dos quais 78 evidenciaram polimorfismo entre os progenitores. Destes, apenas 17 segregaram de acordo com o esperado em uma população F_2 , ou seja, na

proporção 3:1. A segregação dos marcadores foi testada por meio do teste Qui-quadrado ($P < 0,05$). Os 17 *primers* RAPD produziram 17 bandas polimórficas.

3.2. Mapa de Ligação Genética

Para a construção do mapa de ligação da população F_2 derivada do cruzamento entre IAC-100 e BARC8, foram inicialmente definidos o “LOD score” (LOD = 4,0) e a máxima freqüência de recombinação ($r = 0,30$). Dos 107 marcadores, 90 microssatélites e 17 RAPD, 82 agruparam em 22 grupos de ligação, perfazendo um total de 522,4 cM em função de Kosambi. Isto equivale a um marcador a cada 6,37cM, em média (Figura 2). Vinte e cinco marcas não foram alocadas nos grupos de ligação.



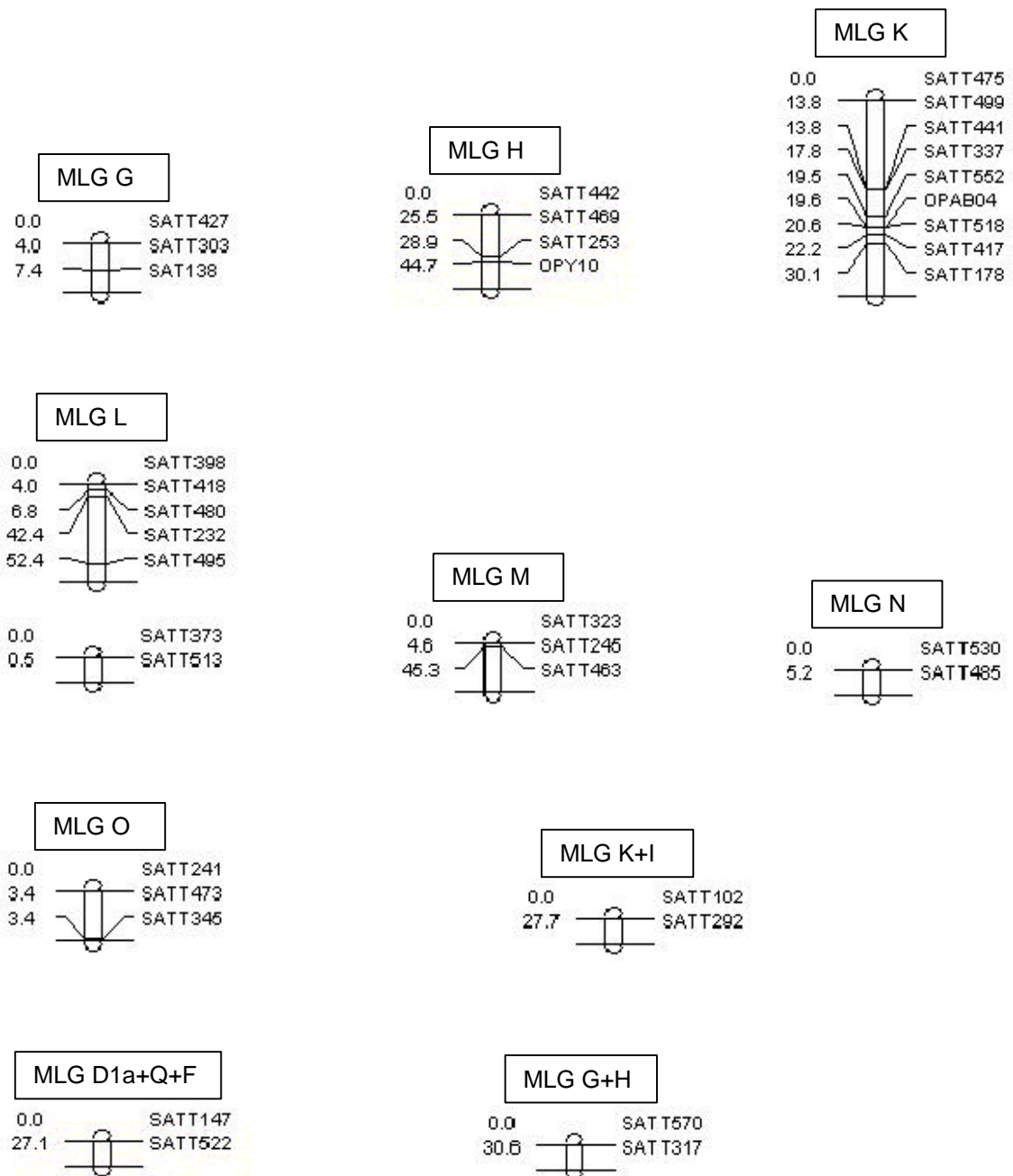


Figura 2 – Mapa genético da soja com base em uma população F_2 constituída por 93 indivíduos obtidos do cruzamento entre a variedades IAC-100 e a linhagem BARC-8. Os grupos de ligação foram obtidos adotando-se os valores de LOD = 4,0 e $r = 0,30$. Os valores à esquerda representam as distâncias entre os marcadores (em cM), e à direita está a designação dos marcadores. A nomenclatura utilizada para os grupos de ligação é a mesma adotada por Cregan *et al.* (1999). As nomenclaturas MLG K+I (tem marcas do grupo MLG K e do grupo MLG I); MLG D1a+Q+F (tem marcas do grupo MLG D1a+Q e do grupo MLG F); MLG G+H (tem marcas do grupo MLG G e do grupo MLG H).

As marcas não ligadas foram: Satt581, Satt521, Satt127, Satt419, Satt516, Satt184, Satt335, Satt226, Satt318, Satt197, Satt353, Satt527, Satt333, Satt144, Satt471, Satt476, OPU02, OPBA08, OPK20, OPO15, OPAW04, OPAM15, OPAE01, OPW13 e OPAF13.

Dos 22 grupos de ligação, a maioria apresentou correspondência com os 20 grupos de ligação obtidos na integração de três mapas públicos de ligação gênica da soja feita por Cregan *et al.* (1999). Foram obtidos dois grupos pequenos pertencentes ao grupo MLG C2, dois pertencentes ao grupo de ligação MLG E e dois pertencentes ao grupo MLG L. Esses resultados são devidos ao pequeno número de marcas utilizadas, sendo necessário uma maior saturação do mapa e conseqüentemente ligação desses grupos em um único grupo. Outro resultado obtido que não apresentou correspondência com o trabalho de Cregan *et al.* (1999), foi que tivemos marcas que foram mapeadas juntas em um mesmo grupo de ligação, mas que, de acordo com esses autores estariam em grupos separados. Foram as seguintes marcas: Satt570 (MLG G) e Satt317 (MLG H), que ficaram juntas em um mesmo grupo; as marcas Satt147 (MLG D1a+Q) e Satt522 (MLG F), que também ficaram juntas em um mesmo grupo e as marcas Satt102 (MLG K) e Satt292 (MLG I) que também agruparam em um mesmo grupo de ligação (Figura 2).

3.3. Análise do Teor de Isoflavonas e de Proteína Total

Trabalhando com essa mesma população, Chiari (2003) detectou seis formas de isoflavonas nas sementes dos progenitores IAC-100 e BARC-8 e nas progêneses F₃. Entretanto, apenas os teores de daidzina, genistina, malonildaidzina, malonilgenistina, isoflavonas totais e proteína foram significativamente contrastantes entre os progenitores, indicando a existência de variabilidade genética entre os progenitores, possibilitando a formação de uma população de base genética bastante ampla para essas características.

As estimativas de herdabilidade no sentido amplo referentes às progêneses F₃, para as características daidzina, genistina, malonildaidzina, malonilgenistina, isoflavonas totais foram superiores a 90%, enquanto proteína apresentou estimativa de herdabilidade de apenas 37% (Chiari, 2003).

Nas mesmas progênies F_3 , foram analisados os coeficientes de correlação fenotípica e genotípica para os teores de daidzina, genistina, malonildaidzina, malonilgenistina e isoflavonas totais, e todos foram positivos e de grande magnitude entre si, variando de 0,80 a 0,98. Esse resultado indica que as plantas com maior teor de daidzina, por exemplo, também apresentam maiores teores de genistina, malonildaidzina, malonilgenistina e de isoflavonas totais, possibilitando proceder a seleção de forma conjunta para essas características (Chiari, 2003).

Em análise realizada por meio de teste de Lillifors, foram observados resultados significativos ($P < 0,01$) para os teores de daidzina, genistina, malonilgenistina e isoflavonas totais, referentes as progênies F_3 , o que indica que os valores dos dados analisados não seguem distribuição normal, enquanto, malonildaidzina e proteína apresentaram distribuição aproximadamente normal (Figura 3).

Meksem *et al.* (2001) avaliaram 100 linhagens recombinantes endogâmicas (RIL) do cruzamento entre duas variedades que contrastavam para as formas de isoflavonas agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) e observaram que essas formas de isoflavonas também não apresentaram distribuição normal.

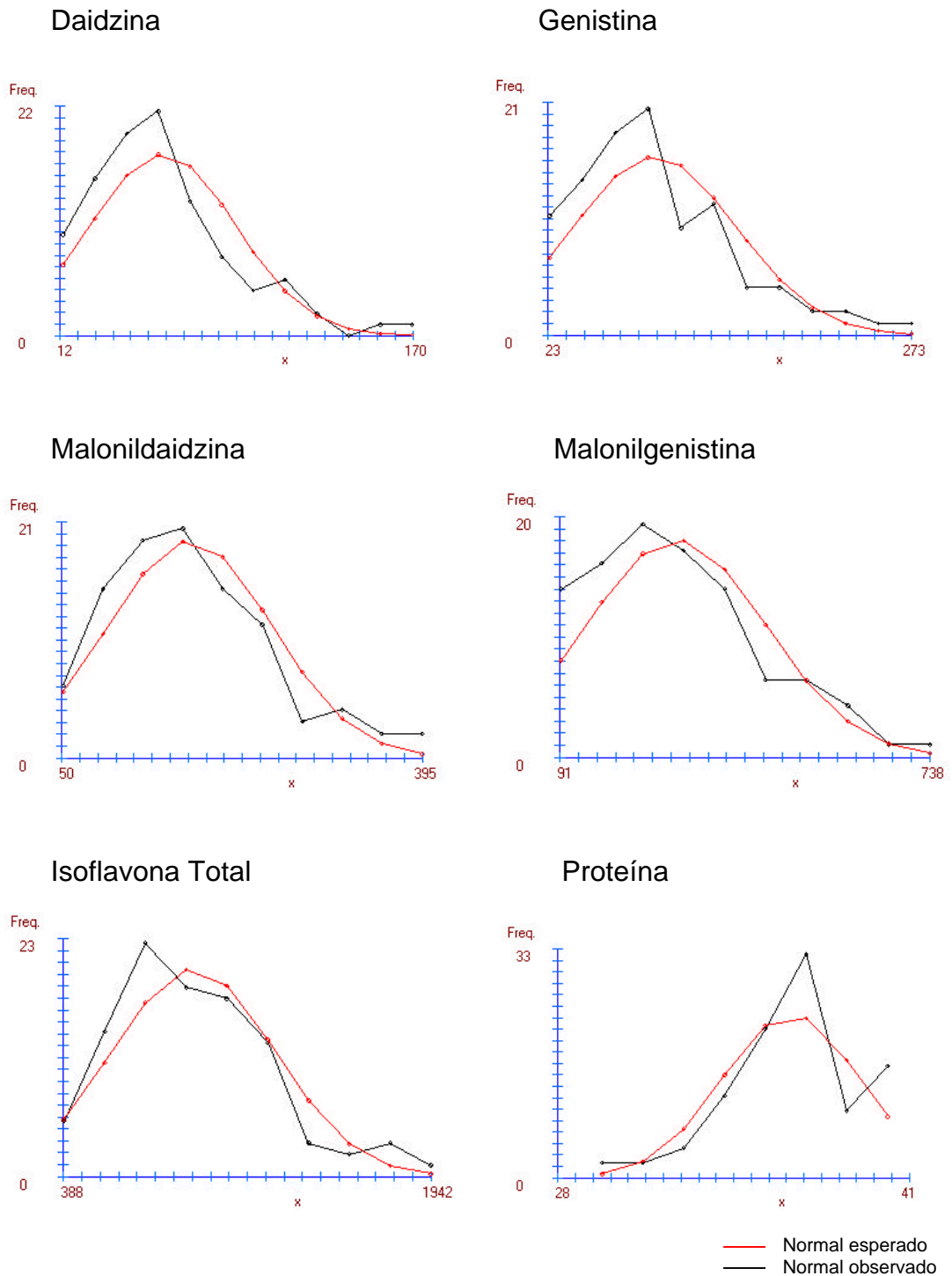


Figura 3 – Distribuição dos teores de daidzina, genistina, malonildaidzina, malonilgenistina, isoflavona total e proteína nas progênes F₃. No eixo das ordenadas, observa-se a freqüência das classes fenotípicas. No eixo das abscissas são apresentadas as classes dos dados fenotípicos para os teores de isoflavonas (µg/g de semente de soja) e proteínas (% de proteínas).

3.4. Associação entre Marcadores e QTLs

Noventa marcadores de microssatélites e dezessete de RAPD, que apresentaram segregação mendeliana esperada, foram submetidos a uma análise de marca simples (análise de variância e regressão) e regressão múltipla, para detecção dos marcadores ligados a regiões que controlam o teor de isoflavonas em sementes de soja. Foram encontradas associações marcador-QTLs para as isoflavonas analisadas e proteína total. Os marcadores relacionados às isoflavonas e proteína, a probabilidade do F, R^2 e o grupo de ligação do marcador estão apresentados nos Quadros 1 e 2.

Daidzina: a análise de regressão linear indicou treze marcadores associados significativamente, sendo o marcador mais fortemente associado o Satt318, que explicou 17,39% da variação do teor de daidzina. Na análise de regressão múltipla, os marcadores Satt318, Satt232 e Satt518 explicaram, juntos, aproximadamente 31,5% do total de variação dessa característica (Quadro 1).

Genistina: a análise de regressão linear indicou seis marcadores associados significativamente, sendo o marcador mais fortemente associado o Satt318, que explicou 16,05% da variação do teor de genistina. Na análise de regressão múltipla, os marcadores Satt318, Satt350, Satt127 e OPK20 explicaram, juntos, aproximadamente 34% do total de variação dessa característica (Quadro1).

Malonildaidzina: a análise de regressão linear indicou onze marcadores associados significativamente, sendo o marcador mais fortemente associado o Satt318, que explicou 16,13% da variação do teor de malonildaidzina. Na análise de regressão múltipla, os marcadores Satt318, Satt232, Satt417 e Satt197 explicaram, juntos, aproximadamente 33% do total de variação dessa característica (Quadro 1)

Malonilgenistina: a análise de regressão linear indicou dezesseis marcadores associados significativamente, sendo o marcador mais fortemente associado o Satt318, que explicou 12,05% da variação do teor de malonildaidzina. Na análise de regressão múltipla, os marcadores Satt318, Satt468, Satt495, Satt350, Satt127 e Satt499 explicaram, juntos, aproximadamente 45% do total de variação dessa característica (Quadro 2).

Isoflavona total: a análise de regressão linear indicou dez marcadores associados significativamente, sendo o marcador mais fortemente associado o Satt318, que explicou 13,59% da variação do teor de isoflavonas total. Na análise de regressão múltipla, os marcadores Satt318, Satt468 e OPAW04 explicaram, juntos, aproximadamente 26% do total de variação dessa característica (Quadro 2).

Proteína total: a análise de regressão linear indicou sete marcadores associados significativamente, sendo os marcadores mais fortemente associados o OPK20 e Satt512, que explicaram 10,06% e 9,49% respectivamente da variação do teor de proteína. Na análise de regressão múltipla, os marcadores OPK20, Satt512, OPU02 e Satt398 explicaram, juntos, aproximadamente 26% do total de variação dessa característica (Quadro 2).

O marcador Satt318 foi comum para todas as isoflavonas analisadas, sendo também o que mais explicou a variação do teor dessas diferentes isoflavonas. Além desse marcador, daidzina e malonildaizina tiveram em comum o marcador Satt232, enquanto genistina e malonilgenistina tiveram em comum o Satt350 e Satt127 que explicam a variação da característica pela regressão múltipla.

Quadro 1 – Marcadores ligados a QTLs de teor de daidzina, genistina e malonildaizina, por meio de regressão simples e regressão múltipla “Stepwise”.

| Análise da Isoflavona Daidzina | | | | | |
|--------------------------------|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Marcadores | Grupo de ligação | Regressão simples | | Regressão múltipla | |
| | | Prob(F) | R ² (%) | Prob(F) | R ² (%) |
| Satt318 | Não-ligado | 0,0** | 17,39 | 16,29 | 16,92 |
| Satt232 | MLG L | 0,04* | 6,88 | 15,77 | 26,84 |
| Satt518 | MLG K | 0,007** | 10,62 | 13,03 | 31,5 |
| Satt552 | MLG K | 0,034* | 7,33 | | |
| Satt411 | MLG E | 0,037* | 7,04 | | |
| Satt527 | Não-ligado | 0,042* | 6,81 | | |
| Satt530 | MLG N | 0,036* | 7,11 | | |
| Satt417 | MLG K | 0,027* | 7,69 | | |
| Satt337 | MLG K | 0,021* | 8,3 | | |
| Satt178 | MLG K | 0,003** | 12,32 | | |
| Satt485 | MLG N | 0,049* | 6,5 | | |
| OPK20 | Não-ligado | 0,0494 * | 4,18 | | |
| OPAW04 | Não-ligado | 0,0213 * | 5,75 | | |

| Análise da Isofavona Genistina | | | | | |
|--------------------------------|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Marcadores | Grupo de ligação | Regressão simples | | Regressão múltipla | |
| | | Prob(F) | R ² (%) | Prob(F) | R ² (%) |
| Satt178 | MLG K | 0,046* | 6,63 | | |
| Satt318 | Não-ligado | 0,0** | 16,05 | 16,26 | 15,3 |
| Satt350 | MLG D1b+W | 0,026* | 7,76 | 13,96 | 23,88 |
| Satt127 | Não-ligado | 0,038* | 7,01 | 12,52 | 29,92 |
| OPK20 | Não-ligado | 0,0074 ** | 7,63 | 11,27 | 34,14 |
| OPAW04 | Não-ligado | 0,0111 * | 6,94 | | |

| Análise da Isoflavona Malonildaizina | | | | | |
|--------------------------------------|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Marcadores | Grupo de ligação | Regressão simples | | Regressão múltipla | |
| | | Prob(F) | R ² (%) | Prob(F) | R ² (%) |
| Satt518 | MLG K | 0,011* | 9,67 | | |
| Satt514 | MLG D2 | 0,045* | 6,74 | | |
| Satt495 | MLG L | 0,043* | 6,74 | | |
| Satt527 | Não-ligado | 0,024* | 7,93 | | |
| Satt318 | Não-ligado | 0,0** | 16,13 | 15,06 | 14,76 |
| Satt232 | MLG L | 0,042* | 6,79 | 14,18 | 24,79 |
| Satt417 | MLG K | 0,029* | 7,59 | 11,0 | 29,40 |
| Satt197 | Não-ligado | 0,04* | 6,92 | 10,33 | 32,98 |
| Satt337 | MLG K | 0,03* | 7,61 | | |
| Satt178 | MLG K | 0,003** | 11,85 | | |
| OPAW04 | Não-ligado | 0,0379* | 4,70 | | |

* Significativo a 5%

** Significativo a 1%

R² (%) acumulado da regressão múltipla

Quadro 2 – Marcadores ligados a QTLs de teor de malonilgenistina, isoflavona total e proteína, por meio de regressão simples e regressão múltipla “Stepwise”.

| Análise da Isoflavona Malonilgenistina | | | | | |
|--|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Marcadores | Grupo de ligação | Regressão simples | | Regressão múltipla | |
| | | Prob(F) | R ² (%) | Prob(F) | R ² (%) |
| Satt282 | MLG D1b+W | 0,041* | 6,94 | | |
| Satt373 | MLG L | 0,038* | 7,06 | | |
| Satt442 | MLG H | 0,044* | 6,7 | | |
| Satt469 | MLG H | 0,036* | 7,15 | | |
| Satt318 | Não-ligado | 0,003** | 12,05 | 11,84 | 11,86 |
| Satt468 | MLG D1a+Q | 0,033* | 7,29 | 12,70 | 22,6 |
| Satt495 | MLG L | 0,02* | 8,37 | 12,56 | 30,46 |
| Satt350 | MLG D1b+W | 0,007** | 10,33 | 11,96 | 36,03 |
| Satt127 | Não-ligado | 0,007** | 10,31 | 12,26 | 42,18 |
| Satt499 | MLG K | 0,012* | 9,32 | 11,35 | 45,07 |
| Satt579 | MLG D1b+W | 0,04* | 6,9 | | |
| Satt436 | MLG D1a+Q | 0,029* | 7,54 | | |
| Satt600 | MLG D1b+W | 0,037* | 7,08 | | |
| Satt178 | MLG K | 0,045* | 6,66 | | |
| OPK20 | Não-ligado | 0,0198 * | 5,82 | | |
| OPAW04 | Não-ligado | 0,0111 * | 6,95 | | |
| Análise da Isoflavona Total | | | | | |
| Marcadores | Grupo de ligação | Regressão simples | | Regressão múltipla | |
| | | Prob(F) | R ² (%) | Prob(F) | R ² (%) |
| Satt442 | MLG H | 0,025* | 7,91 | | |
| Satt436 | MLG D1a+K | 0,031* | 7,46 | | |
| Satt318 | Não-ligado | 0,001** | 13,59 | 13,64 | 13,16 |
| Satt468 | MLG D1a+K | 0,040* | 6,88 | 12,89 | 22,46 |
| OPAW04 | Não-ligado | 0,004 ** | 8,80 | 10,36 | 26,1 |
| Satt527 | Não-ligado | 0,011* | 9,53 | | |
| Satt178 | MLG K | 0,003** | 12,40 | | |
| OPU02 | Não-ligado | 0,047 * | 4,27 | | |
| OPK20 | Não-ligado | 0,018 * | 5,99 | | |
| OPAM15 | Não-ligado | 0,045 * | 4,35 | | |
| Análise de Proteína | | | | | |
| Marcadores | Grupo de ligação | Regressão simples | | Regressão múltipla | |
| | | Prob(F) | R ² (%) | Prob(F) | R ² (%) |
| Satt197 | Não-ligado | 0,020* | 8,35 | | |
| Satt178 | MLG K | 0,040* | 6,9 | | |
| OPK20 | Não-ligado | 0,001** | 10,06 | 10,18 | 10,06 |
| Satt512 | MLG E | 0,011* | 9,49 | 9,99 | 18,17 |
| OPU02 | Não-ligado | 0,025* | 5,35 | 8,34 | 21,95 |
| Satt398 | MLG L | 0,034* | 7,22 | 7,71 | 25,96 |
| OPK16 | MLG E | 0,048* | 4,21 | | |

* Significativo a 5%

** Significativo a 1%

R² (%) acumulado da regressão múltipla.

Os modelos lineares simples, como ANOVA e regressão linear, não necessitam das informações dos mapas de ligação, e a distribuição dos valores fenotípicos é analisada para cada marcador separadamente. Portanto, por utilizarem apenas diferenças entre as médias dos marcadores, não é possível estimar a magnitude do efeito do QTL, nem a sua posição no genoma (Lynch e Walsh, 1997). Desse modo, foi utilizado o método de mapeamento por intervalo composto (Zeng, 1993), com o intuito de aumentar o poder de detecção de QTLs e melhorar a precisão das estimativas do seu efeito e posição. Esse método é baseado na separação do QTL presente no intervalo analisado. O procedimento desconsidera os possíveis QTLs posicionados em outros intervalos, que não estejam sendo analisados, de forma a isolar o efeito de um QTL do efeito de outros possíveis QTLs presentes em intervalos adjacentes.

O ponto de corte para mapeamento de possíveis QTLs, dentro de um intervalo testado, foi obtido por teste de permutação (Deorge e Churchill, 1996). Adotando-se um nível de significância de 5% para o mapa completo, foram obtidos os seguintes pontos de corte: daidzina (16,33), genistina (17,23), malonildaidzina (15,78), malonilgenistina (16,77), isoflavona total (15,81) e proteína (15,96).

Empregando-se este nível de significância, foi mapeado um único QTL, associado com teor de daidzina no grão de soja, no grupo de ligação MLG K, (Figura 4) com pico de LR (*likelihood ratio*) de 16,72, que explica 28% da característica.

Meksem *et al.* (2001) mapearam quatro regiões genômicas que contêm QTLs para teor de isoflavonas agliconas em sementes de soja, sendo dois QTLs para daidzeína presentes nos grupos de ligação A1 e N, e dois QTLs para gliciteína nos grupos B1 e N.

Não foram encontrados QTLs para as demais isoflavonas analisadas e proteína total. Os resultados da análise de marca simples mostrou que o marcador que mais explica todas as isoflavonas foi o Satt318, entretanto, esse marcador não se ligou a nenhum grupo. Foi verificado no mapa de ligação gênica da soja feito por Cregan *et al.* (1999), que o marcador Satt318 pertence ao grupo de ligação MGL B2 e nenhum dos grupos obtidos nesse trabalho apresentou correlação com esse grupo de ligação descrito por esses autores. Esses resultados mostram a necessidade de saturação do mapa,

principalmente com relação aos marcadores presentes no grupo MGL B2, com a finalidade de ligar o marcador Satt318 e, possivelmente mapear QTLs.

Outros marcadores que explicam as características, também, não se agruparam ou estão em grupos pouco saturados, mostrando novamente a necessidade de saturar o mapa e encontrar QTLs para as diferentes características.



Figura 4 – QTL associado a teor da isoflavona daidzina no grupo de ligação MLG K. Foi utilizado nível de significância de 5%. No eixo das ordenadas, estão representados os valores de LR. No eixo das abscissas são apresentadas as distâncias entre os marcadores (em cM).

4. CONCLUSÕES

Os teores de daidzina, genistina, malonilgenistina e isoflavonas totais, referentes as 93 plantas da progênie F₃ não apresentaram distribuição normal, enquanto, malonildaidzina e proteína total apresentaram distribuição aproximadamente normal.

Na análise de agrupamento dos marcadores e construção do mapa de ligação, foram obtidos 22 grupos de ligação pouco saturados, contendo 82 marcadores.

Foram identificados, para daidzina, treze marcadores. Na análise de regressão múltipla as marcas Satt318, Satt232 e Satt518 explicaram, juntas, cerca de 31,5% da variação dos teores dessa isoflavona.

Foram identificados, para genistina, seis marcadores. Na análise de regressão múltipla, as marcas Satt318, Satt350, Satt127 e OPK20 explicaram, juntas, cerca de 34% da variação dos teores dessa isoflavona.

Foram identificados, para malonildaidzina, onze marcadores. Na análise de regressão múltipla as marcas Satt318, Satt232, Satt417 e Satt197 explicaram, juntas, cerca de 33% da variação dos teores dessa isoflavona.

Foram identificados, para malonilgenistina, dezesseis marcadores. Na análise de regressão múltipla, as marcas Satt318, Satt468, Satt495, Satt350, Satt127 e Satt499 explicaram, juntas, cerca de 45% da variação dos teores dessa isoflavona.

Foram identificados, para isoflavona total, dez marcadores. Na análise de regressão múltipla, as marcas Satt318, Satt468 e OPAW04 explicaram, juntas, cerca de 26% da variação em torno desse caráter.

Foram identificados, para proteína total, sete marcadores. Na análise de regressão múltipla, as marcas OPK20, Satt512, OPU02 e Satt398 explicaram, juntas, cerca de 26% da variação fenotípica.

Empregando-se o método de mapeamento por intervalo composto, foi identificado um único QTL associado ao teor da isoflavona daidzina no grupo de ligação K, que explicou 28% desta característica.

As marcas que mais explicaram as diferentes características avaliadas não se ligaram aos grupos de ligação e, estudos posteriores deverão ser

conduzidos, visando aumentar o grau de saturação do mapa. Isto poderá permitir a identificação de QTLs para as diferentes características analisadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, Washington, DC, 1975, 1094 pp.
- Barnes, S; Kim, H.; Xu, J. Soy the prevention and treatment of chronic diseases. *In: Anais do Congresso Brasileiro de Soja*, Londrina, p. 265-308, 1999.
- Basten, C.J., Zeng, Z.-B; Wang, S. **Windows QTL cartographer; version 2.0**. Raleigh, NC: Department of Statistics, North Caroline State University, 2002.
- Carrão-Panizzi, M.; Kitamura, K. Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. **Breeding Science**, v. 45, n. 3, p. 295-300, 1995.
- Chiari, L.; **Herança do teor de isoflavonas em sementes de soja (*Glycine max*(L.) Merrill)**. Viçosa, MG, UFV, 2003. 65p. (Tese D. S.)
- Cregan, P. B.; Jarvik, T.; Bush, R. C.; Shoemaker, R. C.; Lark, K. G.; Kahler, A. L.; Kaya, N.; Vantoai, T. T.; Lohnes, D. G.; Chung, J.; Spexht, J. E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, v.39, n.5, p.1464-1490, 1999.
- Cruz, C. D.; Schuster, I. Programa Gqmol (Viçosa, Brasil). Universidade Federal de Viçosa, 2000. <http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>
- Deorge, R. W.; Churchill, G. A. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. **Genetics**, v.142, n.1, p.285–294, 1996.
- Erdman, J. W. Jr; Potter, S. M. Soy and bone health. **The Soy Connection**, v. 5, n. 2, p. 1-4, 1997.
- Hayward, M. D.; McAdam, N. J.; Jones, J. G.; Evans, C.; Evans, G. M.; Forster, J. W.; Ustin, A.; Hossin, K. G.; Quader, B.; Stammers, M.; Will, J. K. Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses. **Euphytica**, v.77, n.3, p. 269 – 75, 1994.
- Kurzer, M. S. Hormonal effects of soy isoflavones: studies in premenopausal and postmenopausal women. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 660S-661S, 2000.
- Leffel, R.C. Registration of high-protein soybean germplasm lines BARC-6, BARC-7, BARC-8 and BARC-9. **Crop Science**, v. 32, p. 502, 1992.
- Lincoln, S.; Daly, M.; Lader, E. **Constructing genetic maps with MAPMARKER/EXP 3.0: tutorial and reference manual**. 2.ed. Cambridge, MA: Whitehead Institute, Technical Report, 1993.

- Lynch, M.; Walsh, B. Genetics and analysis of quantitative genetics. **Sinauer Associates**. 990p. 1997.
- McDonald, M.B., Elliot, E.J., Sweeney, P.M. DNA extraction from seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science & Technology**. v. 22, p.171-176, 1994.
- 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, n. 1, p. 38-44, 2001.
- Nilausen, K.; Meinertz, H. Lipoprotein (a) and dietary proteins: casein lowers lipoprotein (a) concentrations as compared with soy protein. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 419-425, 1999.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory. 1989.
- Singh, L.; Hadley, H. H. Maternal and cytoplasmic effects on seed protein content in soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, v. 12, p. 583-585, 1972.
- Tikkanen, M. J.; Wähälä, K. Ojala, S.; Wihma, V.; Adlercreutz, H. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, p.3106-3110, 1998.
- Wang, H. J.; Murphy, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1674-1677, 1994.
- Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A.; Tingey, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.13, p.6531-6535, 1990.
- Zeng, Z. B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effect in mapping quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p.10972–10976, 1993.