

## MARCADOR RAPD-PCR LIGADO AO GENE *Cgy1* DE SOJA

Apoio financeiro: CNPq, PDACT/FINEP e Nestlé.

Marley Marico Utumi<sup>1</sup>, Everaldo Gonçalves de Barros<sup>2</sup>, Carlos Siguelyuki Sedyiyama<sup>3</sup> e Maurílio Alves Moreira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Eng.Agr., Dr., Embrapa Rondônia, Caixa Postal 405, CEP 78995-000, Vilhena, RO, Brasil, [marleyutumi@netview.com.br](mailto:marleyutumi@netview.com.br)

<sup>2</sup>Prof. Titular, Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP 36571-000, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>3</sup>Prof. Titular, UFMG.

<sup>4</sup>Prof. Titular, UFV.

O teor protéico da soja varia de 35 a 45% e, apesar da produção brasileira ser a segunda maior do mundo, o consumo humano é baixo. A remoção do "beany flavor" e o aumento do teor de metionina poderão incrementar seu uso como fonte protéica nos alimentos. O "beany flavor" é causado principalmente por hidroperoxidação de ácidos graxos pelas isoenzimas lipoxygenase (LOX) das sementes. A proteína de soja tem baixa qualidade nutricional, mas entre os vários polipetídeos das proteínas de reserva alguns possuem menor teor de metionina que outros, como a' (da b-conglicinina) e A5A4B3 (da glicinina). No programa de melhoramento genético de soja para consumo humano, da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG, foram obtidas linhagens com melhor qualidade nutricional e organoléptica objetivando lançamento de variedades mais adequadas para consumidores dos países ocidentais.

O objetivo deste trabalho foi identificar marcador molecular do tipo "Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction" (RAPD-PCR) ligado ao gene *Cgy1*, gene este que codifica a síntese da subunidade protéica a'.

Os genótipos utilizados foram: Keburi (sem a'), linhagem UFV91.751 (seleção sem LOX 2 e 3 do cruzamento FT-Cristalina/Ichigowase//PI86023), linhagem PBTN (sem LOX1, 2 e 3 de Paranaíba/Ichigowase//PI86023//M3) e KC3 (sem a' e LOX3 de UFV91751/Keburi). M3 é um mutante sem LOX 1, 2 e 3, obtido no Japão pelo "National Institute of Radiation Breeding", por radiação gama.

Foram efetuados cruzamentos de PBTN com KC3 e as sementes das plantas F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> foram analisadas não destrutivamente em eletroforese em gel de poliacrilamida com uréia e dodecil sulfato de sódio (SDS-Uréia-PAGE) (Figura 1).

As técnicas RAPD-PCR (Williams, J.G.K. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535. 1990) e Bulk Segregant Analysis (BSA) (Michelmore, R.W. PNAS USA, 8:9828-9832. 1991) foram utilizadas na população F<sub>2</sub> de PBTN/KC3. Cada bulk contrastante, com ou sem a subunidade a', foi formado por alíquotas equivalentes de sete indivíduos homocigotos.

Foram coletadas folhas jovens de plantas no estádio V5, as quais foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80° C, para extração de DNA, como indicado por Doyle e Doyle (Focus 12:13-15. 1990). Foram utilizados mil *primers* decâmeros, das séries Operon A a W e AA a AW (Operon Technologies) para amplificar o DNA dos bulks. Cada reação de amplificação de 25 µl continha: 30 ng de DNA; 100 mM de cada deoxiribonucleosídeo trifosfatado; 2,8 mM de MgCl<sub>2</sub>; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM de KCl; 0,4 mM de um primer e uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Perkin Elmer-Cetus Corp.). As reações foram realizadas em termociclador modelo 9600 (Perkin Elmer-Cetus Corp.) em 40 ciclos; cada ciclo consistia de desnaturação a 94° C/15s, pareamento a 35° C/30s e alongação a 72° C/um min. Após o 40º ciclo procedeu-se à alongação final por sete min a 72° C. Os produtos de amplificação foram separados em géis de agarose a 1,2% imersos em tampão TBE (0,09 M de Tris-Borato, 1 mM de EDTA, pH 8,0) corados com brometo de etídio. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz UV e as imagens transmitidas e arquivadas num sistema Eagle Eye II. O marcador de tamanho foi DNA de fago I digerido com as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, and *Hind*II.

Dentre os *primers* testados o OPZ05 gerou uma banda polimórfica de 1.040 pares de base (pb) que co-segregou na população F<sub>2</sub> com o alelo recessivo que leva à ausência da subunidade a'. O fragmento OPZ05<sub>1040</sub> ocorreu em indivíduos heterocigotos e indivíduos sem a' (Figura 2).

A distância entre o marcador e o gene **Cgy1** foi estimada em 10,6 cM, pelo processamento dos resultados da análise de 171 indivíduos F<sub>2</sub> em PAGE-uréia-SDS e amplificação com OPZ05, no programa MapMaker v2. Dos 171 indivíduos analisados 127 indivíduos possuíam a subunidade a' e 44 não; todos os homozigotos que possuíam a subunidade não geraram a banda polimórfica, todos os heterozigotos geraram a banda e todos os indivíduos sem a subunidade a', exceto dois, apresentaram a banda OPZ05<sub>1040</sub>.

O marcador OPZ05<sub>1040</sub> é dominante como a grande maioria dos marcadores RAPD, pode ser útil para verificar a efetividade de cruzamentos quando o genitor masculino ou genitor não recorrente não apresentarem a subunidade a', para reduzir as gerações de autofecundação, pois discrimina indivíduos que possuem a' mas são heterozigotos, e para diminuir o tamanho de populações nos programas de melhoramento, porque possibilita a seleção antes da síntese de a'.



Figura 1. Gel SDS-Uréia-PAGE mostrando lipoxigenases e subunidades de proteínas de reserva. As linhas são: 1) Cristalina; 2) PBTN; 3) UFV91751; 4) Keburi; 5) F<sub>3</sub> PBTN//UFV91751/Keburi; 6) F<sub>3</sub> PBTN//UFV91751/Keburi, sem a'; 7) F<sub>3</sub> PBTN//UFV91751/Keburi, sem A5A4B3; 8) F<sub>3</sub> PBTN//UFV91751/Keburi, sem a' e A5A4B3. corado com Coomassie blue.

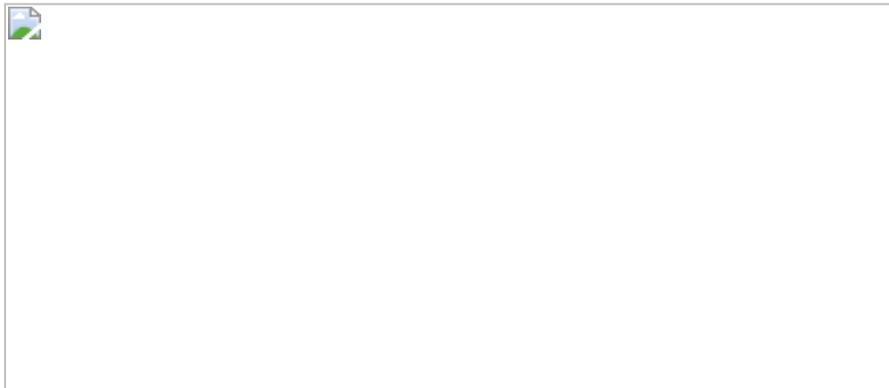


Figura 2. Gel de agarose corado com brometo de etídio exibindo bandas de DNA de soja amplificadas por RAPD produzidas pelo primer OPZ05. Linhas: (M) DNA de fago I digerido com *Bam*HI, *Eco*RI, and *Hind*II; (1)KC3; (2)PBTN; (3) Cristalina; (4) F<sub>1</sub> (PBTN/KC3); (5) bulk com a'; (6)bulk sem a'; (7 a 9) indivíduos F<sub>2</sub> sem a'; (10 a 15) indivíduos heterozigotos com a'; (16 a 18) indivíduos F<sub>2</sub> homozigotos com a'. A banda polimórfica de 1.040 pb está indicada pela seta.

