

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de**  
**Sementes**



**TESE**

**Identificação de genes diferencialmente expressos em tegumentos  
de sementes de soja com caracteres contrastantes**

**Liliane Marcia Mertz**

**Pelotas, fevereiro de 2010.**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**LILIANE MARCIA MERTZ**

**Identificação de genes diferencialmente expressos em tegumentos  
de sementes de soja com caracteres contrastantes**

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Professor Paulo Dejalma Zimmer, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Orientador: Paulo Dejalma Zimmer**

**Pelotas, fevereiro de 2010.**

## **Dados de catalogação na fonte:**

( Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744 )

M575i Mertz, Liliane Marcia

Identificação de genes diferencialmente expressos em tegumentos de sementes de soja com caracteres contrastantes / Liliane Marcia Mertz ; orientador Paulo Dejalma Zimmer. - Pelotas,2010.-59f. ; il..- Tese ( Doutorado ) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1. Glycine max 2.Tegumento preto 3.Qualidade de sementes I Zimmer, Paulo Dejalma(orientador) II .Título.

## **Comitê de Orientação**

Paulo Dejalma Zimmer

Francisco Amaral Villela

Antônio Carlos Souza Albuquerque Barros

## **Banca Examinadora**

---

Silmar Teichert Peske  
FAEM/UFPel

---

Leopoldo Baudet  
FAEM/UFPel

---

Luciano Carlos da Maia  
FAEM/UFPel

---

Caroline Marques Castro  
Embrapa CPACT

---

Paulo Dejalma Zimmer  
Orientador

## **Dedico**

*Aos meus pais, Olivio e Herta, minha eterna gratidão pelo amor, apoio e pela educação que me proporcionaram.*

*Ao meu noivo Fernando pelo amor, dedicação e acima de tudo, companheirismo em todos esses anos de convivência.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus acima de tudo.

À minha família que mesmo de longe sempre torceu por mim.

Ao Ademar, Sueli e Mário, por todo apoio e carinho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da UFPel, em especial ao orientador desse trabalho professor Paulo Dejalma Zimmer, pela orientação e amizade.

Ao Centro de Biotecnologia da UFPel, em especial ao professor Odir Dellagostin, por todo auxílio prestado durante a execução do trabalho e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Doutor Ademir Assis Henning, pelo apoio e incentivo.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Sementes pela amizade e convivência.

Ao professor e amigo do Centro de Genômica e Fitomelhoramento da UFPel, Luciano C. da Maia (Paulista), pela agradável convivência e pelas valiosas discussões no decorrer do trabalho.

A Diovana Dellagostin, professora de inglês e acima de tudo amiga por todo apoio e incentivo.

Ao CNPq, CAPES e FAPERGS, pela concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro.

# **Identificação de genes diferencialmente expressos em tegumentos de sementes de soja com caracteres contrastantes – UFPel 2010.**

Autora: Liliane Marcia Mertz

Orientador: Paulo Dejalma Zimmer

## **RESUMO**

Alguns genótipos de soja possuem o tegumento da semente com coloração preta, os quais são semi-permeáveis a água, menos susceptíveis aos danos mecânicos, as adversidades climáticas, a deterioração por umidade e a ocorrência de patógenos. Nesse sentido, a identificação de genes responsáveis por esses caracteres pode auxiliar o desenvolvimento de variedades com melhor qualidade de semente. O objetivo desse estudo foi identificar genes diferencialmente expressos entre tegumentos de sementes de soja de dois genótipos, o TP (linhagem com tegumento preto, semi-permeável e mais resistente a deterioração) e a cultivar CD 202 (tegumento amarelo, permeável e considerado menos resistente a deterioração). Através da técnica de cDNA-AFLP foram obtidos 47 fragmentos de cDNA diferencialmente expressos, 25 na linhagem TP e 22 na cultivar CD 202. Fragmentos presentes apenas na linhagem TP foram recuperados do gel, clonados e sequenciados. Os genes correspondentes as proteínas flavonóide 3'-hidroxilase, proteína arabinogalactana, lipoxigenase, ciclofilina, proteína induzida por ácido salicílico, proteína com domínio dedo de zinco e proteína com domínio TCP, apresentaram-se diferencialmente expressos entre tegumentos de sementes de soja de coloração preta e coloração amarela. Algumas dessas proteínas possuem relação com a qualidade fisiológica de sementes e podem auxiliar a explicar as diferenças fenotípicas existentes entre os tegumentos dos genótipos TP e CD 202.

Palavras-chaves: tegumento preto, *Glycine max*, qualidade de sementes.



# Identification of differentially expressed genes in soybean seed coat with contrasting characters – UFPel 2010

Author: Liliane Marcia Mertz

Adviser: Paulo Dejalma Zimmer

## SUMMARY

Some soybean genotypes have black seed coat, which are semi-permeable to water, less susceptible to mechanical damages, less affected by weather adversities, deterioration by humidity and pathogen occurrence. Identifying genes and proteins that are responsible for these characteristics can help the development of varieties with higher seed quality. The aim of this study was to identify differentially expressed genes between soybean seed coats from two genotypes, the isolate TP (with black seed coat, semi-permeable and more resistant to deterioration) and the cultivar CD 202 (with yellow seed coat, permeable and less resistant to deterioration). By cDNA-AFLP analysis 47 cDNA fragments differentially expressed between these genotypes were obtained, 25 from BC genotype and 22 from YC genotype. Fragments presented just in BC genotype were recovered from the gel, cloned and sequenced. Genes corresponding to proteins flavonoid 3'-hydroxylase, fascilin-like arabinogalactan protein, lipoxygenase, cyclophilin, salicylic acid induced protein, zinc finger protein and TCP-like domain protein I were differentially expressed between black and yellow soybean seed coats. Some of these proteins are related to seed physiological quality and can help to explain the phenotypic differences between seed coats from TP and CD 202 genotypes.

Keywords: black coat, *Glycine max*, seed quality.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	v
SUMMARY.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. A Cultura da Soja .....	4
2.2. Tegumento da semente de soja .....	6
2.3. Propriedades do tegumento e sua relação com a qualidade de sementes	10
2.4. Expressão gênica diferencial pela técnica de cDNA-AFLP.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Produção do material vegetal e obtenção dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos.....	16
3.2. Resgate e purificação das bandas selecionadas.....	18
3.3. Clonagem dos fragmentos de cDNA reamplificados.....	19
3.3.1. Preparo de células competentes.....	19
3.3.2. Reação de ligação.....	20
3.3.3. Transformação por eletroporação .....	20
3.3.4. Seleção das colônias transformadas.....	21
3.3.5. Extração do DNA plasmidial.....	22

3.3.6. Digestão do DNA com enzimas de restrição.....	23
3.4. Sequenciamento dos fragmentos de cDNA.....	25
3.5. Análise <i>in silico</i> .....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1. Clonagem dos fragmentos de cDNA.....	28
4.2. Identificação da possível função dos genes através de análise <i>in silico</i> ..	31
4.3. Identificação de mutações entre as sequências similares através de alinhamento global.....	36
5. CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS.....	57

## LISTA DE TABELAS

1. Proteínas que apresentaram similaridade com sequências de cDNA diferencialmente expressas entre tegumentos de sementes de soja de coloração preta e amarela..... 33
2. Alteração na composição de aminoácidos da proteína lipoxigenase expressa em tegumentos de sementes de soja de coloração preta. Cores diferentes representam os grupos classificados em função do radical. Vermelho (Apolar), azul (polar neutro), preto (polar ácido), verde (polar básico)..... 38

## LISTA DE FIGURAS

1. Tegumento de semente de soja em corte transversal p – epiderme ou camada paliçádica, h – hipoderme, pa – células parenquimatosas, c – células remanescentes do parênquima e endotélio, a – camada de aleurona, em – células remanescentes do endosperma. Fonte: Miller et al. (1999)..... 6
2. Depósitos de substâncias na superfície da cutícula do tegumento de sementes de soja. Fonte: Ma et al. (2004)..... 8
3. Coloração do tegumento de sementes de soja, controlada pelos locos (*I*, *R* e *T*). *IRT* e *IRt* (tegumento amarelo); *I<sup>\*</sup>RT* e *I<sup>\*</sup>Rt* (preto-imperfeito); *iRT* e *iRt* (preto); *irT* (marrom); *irt* (camurça). Fonte: Zabala e Vodkin (2003)..... 9
4. Corte transversal de tegumentos de sementes de soja aos 55 dias após a antese. A) Genótipo TP (tegumento preto) ; B) Cultivar CD 202 (tegumento amarelo). Fonte: Mertz et al. (2009)..... 12
5. Tegumento de sementes de soja do genótipo TP em diferentes fases de desenvolvimento..... 17
6. Tegumento de sementes de soja do genótipo CD - 202 em diferentes fases de desenvolvimento..... 17
7. Colônias recombinantes em fragmentos de cDNA clonados no vetor *pCR*

2.1 TOPO. Colônias azuis (não recombinantes/sem fragmento), colônias brancas (recombinantes/com fragmento).....	21
8. Mapa do vetor <i>pCR 2.1 TOPO</i> , utilizado para clonagem dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos entre os tegumentos de sementes de soja de coloração preta e amarela. As setas indicam os sítios de restrição das enzimas <i>Xba</i> e <i>Hind</i> III, utilizadas para digestão do DNA recombinante.....	25
9. Agrupamento das repetições das leituras do sequenciamento no sentido senso e anti-senso dos cDNAs expressos em tegumentos de sementes de soja de coloração preta, analisadas pelo programa <i>ContigExpress® Vector NTI 10.0 suite</i> (Invitrogen).....	26
10. Bandas polimórficas oriundas da técnica de cDNA-AFLP, resgatadas do gel de poliácridamida e reamplificadas. M – marcador de peso molecular 1Kb. Gel de agarose 2%.....	28
11. DNA plasmidial extraído de colônias recombinantes utilizando o <i>FlexiPrep™ Kit</i> (GE Healthcare) e visualizado em gel de agarose 0,7%. CO – controle.....	29
12. Amostras de DNA recombinante digeridos com enzimas de restrição <i>Xba</i> I e <i>Hind</i> III. Bandas 1 a 22 – Fragmentos clonados oriundos da técnica de cDNA-AFLP. CO – Controle sem inserto. Gel de agarose 2%.....	30
13. Repetição da digestão das amostras de DNA recombinante, digeridos com as enzimas de restrição <i>Xba</i> I e <i>Hind</i> III. CO – Controle sem inserto. Gel de agarose 2%.....	30
14. Alinhamento global entre sequência de cDNA obtida em tegumento de sementes de soja com coloração preta e a sequência da proteína,	

proteína arabinogalactana ( <i>Fasciclin-like arabinogalactan protein</i> (ABV27485.1) - <i>Gossypium hirsutum</i> ).....	40
15. Alinhamento global entre sequência de cDNA obtida em tegumento de sementes de soja com coloração preta e a sequência da proteína com domínio TCP ( <i>TCP domain-like protein I</i> (ABD72481.1) - <i>Gossypium hirsutum</i> ).....	41
16. Alinhamento global entre sequência de cDNA obtida em tegumento de sementes de soja com coloração preta e a sequência da proteína com domínio dedo de zinco, ( <i>Zinc finger, RING-type</i> (ABE86663.2) - <i>Medicago truncatula</i> ).....	42
17. Alinhamento global entre sequência de cDNA obtida em tegumento de sementes de soja com coloração preta e a sequência da proteína ciclofilina, ( <i>Cyclophilin</i> (ACG70968.1)), <i>Ziziphus jujuba</i> .....	43
18. Alinhamento global entre sequência de cDNA obtida em tegumento de sementes de soja com coloração preta e a sequência de proteína induzida por ácido salicílico, ( <i>Salicylic acid induced protein</i> (CD391498.1) – <i>Glycine max</i> ).....	44
19. Alinhamento global entre sequência de cDNA obtida em tegumento de sementes de soja com coloração preta e a sequência da proteína flavonóide 3`hidroxilase ( <i>Flavonoid 3'-hydroxylase</i> (ABW69385) - <i>Glycine max</i> cultivar Williams).....	45
20. Alinhamento global entre sequência de nucleotídeos da proteína lipoxigenase ( <i>Lipoxygenase</i> (U26457.1) - <i>Glycine max</i> ) e a sequência de cDNA obtida em tegumentos de sementes de soja de coloração preta. Setas pretas indicam alterações nucleotídicas que resultam na	

substituição do aminoácido, setas vermelhas indicam mutações silenciosas, setas azuis mutações que ocorreram após o códon de terminação.....	46
21. Alinhamento global entre sequência de aminoácidos da proteína lipoxigenase ( <i>Lipoxygenase</i> (U26457.1) - <i>Glycine max</i> ) e a sequência de cDNA obtida em tegumentos de sementes de soja de coloração preta. Setas indicam locais onde houve a troca de aminoácidos.....	47
22. RNA total em gel de agarose 1%, extraído de tegumentos de soja da linhagem TP aos 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 dias após a antese, utilizando o reagente <i>Pure Link Plant RNA</i> (Invitrogen).....	57
23. RNA total em gel de agarose 1%, extraído de tegumentos de soja da cultivar CD-202 aos 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 dias após a antese, <i>Pure Link Plant RNA</i> (Invitrogen).....	57
24. cDNA-AFLP em gel de poliacrilamida 5%, de tegumentos de sementes de soja de dois genótipos, TP (Tegumento Preto) e CD 202 (Tegumento amarelo), com diferentes combinações de iniciadores. P1- <i>EcoRI</i> -ACC/ <i>Msel</i> -CTC, P2- <i>EcoRI</i> -ACT/ <i>Msel</i> -CAT, P3- <i>EcoRI</i> -ACG/ <i>Msel</i> -CTT, P4- <i>EcoRI</i> -AGC/ <i>Msel</i> -CAC, M-Marcador de peso molecular 30-330pb. Setas indicam genes diferencialmente expressos entre os dois genótipos.....	58
25. cDNA-AFLP em gel de poliacrilamida 5%, de tegumentos de sementes de soja de dois genótipos, TP (Tegumento Preto) e CD 202 (Tegumento amarelo), com diferentes combinações de iniciadores. P5- <i>EcoRI</i> -AGC/ <i>Msel</i> -CTC, P6- <i>EcoRI</i> -AGG/ <i>Msel</i> -CTG, P7- <i>EcoRI</i> -AAG/ <i>Msel</i> -CTC, P8- <i>EcoRI</i> -AGG/ <i>Msel</i> -CTC, M-Marcador de peso molecular 30-330pb. Setas indicam genes diferencialmente expressos entre os dois genótipos...	59



## **1. INTRODUÇÃO**

A cultura da soja assume valor sócio-econômico devido à importância de seus produtos, principalmente farelo, óleo vegetal e seus derivados, tanto para o mercado interno como externo. No Brasil, durante a safra 2008/09, foram cultivados aproximadamente 22 milhões de hectares de soja, com uma produção que ultrapassou 57 milhões de toneladas e taxa de utilização de sementes de 61% o que gera uma demanda efetiva de aproximadamente 13,5 milhões de sacas de sementes (ABRASEM, 2009; CONAB, 2009).

A utilização de sementes de qualidade é primordial para o sucesso da produção, pois é por meio destas que as tecnologias introduzidas pelo melhoramento genético são levadas até o agricultor. Por esse motivo, torna-se necessário o estabelecimento de programas de melhoramento, onde o fator qualidade de sementes também tenha prioridade.

Alguns estudos têm mostrado que apesar da alta tecnologia disponível, a qualidade das sementes de soja tem sido severamente comprometida em função dos elevados índices de deterioração por umidade e de ruptura do tegumento (MESQUITA et al., 1999; COSTA et al., 2001).

A exposição das sementes de soja a ciclos alternados de elevada e baixa umidade antes da colheita, devido à ocorrência de chuvas frequentes ou às

flutuações diárias da umidade relativa do ar, resulta na deterioração por umidade a qual, pode ser apontada como uma das principais causas para redução na qualidade das sementes.

O tegumento é um dos condicionantes da capacidade de germinação, do vigor e da longevidade das sementes. Grande parte das características do tegumento está associada a problemas específicos apresentados pelas sementes. A susceptibilidade a danos mecânicos está associada ao seu teor de lignina, enquanto que longevidade e potencial de deterioração no campo têm sido relacionados ao grau de permeabilidade do tegumento (SOUZA e MARCOS FILHO, 2001).

Entre os genótipos de soja existe variabilidade genética quanto à qualidade de sementes, a qual pode ser utilizada em programas de melhoramento genético. Inúmeros pesquisadores afirmam que tegumentos de sementes de soja com coloração preta apresentam maior espessura da epiderme, menor taxa de embebição, maior resistência a deterioração de campo, maior conteúdo de lignina e maior tolerância ao ataque de microorganismos, em comparação as cultivares não pigmentadas (PESKE e PEREIRA, 1983; TAVARES et al., 1987; KUO, 1989; CHACHALIS e SMITH 2000; MERTZ et al., 2009).

Atualmente, há grande interesse na incorporação de genes específicos no tegumento de sementes de soja, associados à qualidade de sementes. Nesse contexto, a biologia molecular é uma alternativa para identificação de genes envolvidos nas respostas fisiológicas das sementes.

A técnica de cDNA-AFLP (Polimorfismo do comprimento de fragmentos de cDNA amplificados) é uma ferramenta eficiente para o isolamento de genes diferencialmente expressos, além de fornecer resultados reproduzíveis que foram confirmados em vários estudos (HABU et al., 1997; MAO et al., 2004).

Considerando a demanda por pesquisas com enfoque genético-molecular de características relacionadas à qualidade de sementes, realizou-se esse estudo com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos entre tegumentos de sementes de soja de dois genótipos, o TP (linhagem com tegumento preto, semi-permeável e mais resistente a deterioração) e a cultivar CD 202 (tegumento amarelo, permeável e considerado menos resistente a deterioração).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A Cultura da Soja

A soja é originária da Ásia, mais precisamente da China. A primeira referência sobre a soja no Brasil data de 1882, relatando seu cultivo no estado da Bahia. No Brasil, a soja encontrou condições edafo-climáticas favoráveis na região Sul, expandindo-se posteriormente para outras regiões, principalmente para o Centro-Oeste (ROESSING et al., 2000).

A soja pertence à ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, gênero *Glycine* e espécie *Glycine max* (L.) Merrill. Essa espécie possui número de cromossomos diplóide  $2n=40$ . O germoplasma da soja contém grande número de tipos de plantas, bem como, ampla forma de resistência a pragas e caracteres morfológicos e fisiológicos distintos.

Na safra 2008/2009 a produção mundial de soja foi de 210,6 milhões de toneladas cultivadas em 96,3 milhões de hectares. O maior produtor mundial é os Estados Unidos que produziu 80,5 milhões de toneladas do grão, em uma área de 30,2 milhões de hectares com produtividade média de  $2.666 \text{ Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  (USDA, 2009). O Brasil ocupa a segunda posição produzindo 57,1 milhões de toneladas

do grão em 22 milhões de hectares, produtividade média de 2.629 Kg.ha<sup>-1</sup>.

A cultura da soja assume valor sócio-econômico, devido à importância de seus produtos, principalmente farelo, óleo vegetal e seus derivados, tanto para o mercado interno como externo. No Brasil, até meados dos anos 60 a soja não tinha grande importância econômica, o maior aumento de produção ocorreu na década de 70 a 1980, passando de 1,5 para 15,2 milhões de toneladas (aumento de 25,9% ao ano). Nos anos 80, o Cerrado brasileiro começou a ter importância econômica como região produtora (ROESSING et al., 2000).

Atualmente o estado do Mato Grosso é o maior produtor brasileiro, na safra 2008/09 o estado produziu aproximadamente 18 milhões de toneladas, seguido pelo Paraná com 9,5 milhões de toneladas (CONAB, 2009).

A evolução inicial da soja no Brasil foi fortemente amparada pelo desenvolvimento de tecnologias que possibilitaram o aumento da área de cultivo. No entanto, com a estabilização da área de cultivo, verificou-se um aumento significativo na produtividade, devido à utilização de novas tecnologias e ao desenvolvimento de cultivares adaptadas às diversas regiões produtoras (ROESSING et al., 2000).

Nesse sentido, a semente possui papel fundamental como agente transferidor de tecnologia, uma vez que ao levar para a propriedade sementes de uma variedade, o produtor está levando toda a moderna tecnologia existente nos programas de melhoramento genético. Para que todos os esforços realizados na obtenção de uma variedade sejam traduzidos em benefícios para a produção agrícola é fundamental a utilização de sementes de alta qualidade (SHUSTER, 2003).

## 2.2. Tegumento da semente de soja

O tegumento da semente de soja é a camada externa da semente, originado a partir dos integumentos do óvulo. Estudos utilizando microscopia eletrônica demonstraram que a estrutura básica do tegumento compreende quatro camadas: cutícula, epiderme, hipoderme e parênquima (Figura 1) (SWANSON et al., 1985).

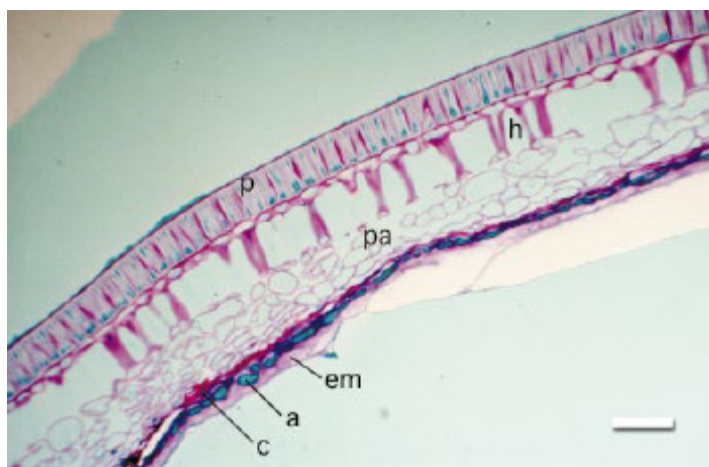


Figura 1. Tegumento de semente de soja em corte transversal p-epiderme ou camada paliçádica, h - hipoderme, pa - células parenquimatosas, c - células remanescentes do parênquima e endotélio, a - camada de aleurona, em - células remanescentes do endosperma. Fonte: Miller et al. (1999).

A cutícula é a fina camada externa do tegumento, a qual possui estrutura variável e representa a primeira barreira à embebição (RAGUS, 1987).

A epiderme é formada por células paliçádicas, as quais formam uma camada contínua envolvendo a semente com exceção do hilo, onde aparece uma segunda camada paliçádica proveniente do funículo. A camada paliçádica é constituída de células esclerenquimatosas, chamadas macroesclerídeos. Essas células são alongadas perpendicularmente à superfície do tegumento, possuindo paredes celulares espessas e perfuradas na porção superior (PESKE e PEREIRA, 1983).

Abaixo da epiderme encontra-se a hipoderme, camada unicelular formada por osteoesclerídeos, células esclerenquimatosas com parede celular de espessura desuniforme, constituindo uma camada de suporte com considerável espaço intercelular. Essas células não são observadas no hilo, entretanto, os osteoesclerídeos adjacentes ao hilo são maiores que nas áreas mais distanciadas causando uma variação na espessura da camada de 30 a 70 microns. A quarta camada é constituída por células parenquimatosas as quais possuem forma alongada e apresentam-se distribuídas ao longo de toda a superfície (PESKE e PEREIRA, 1983).

Além dessas estruturas, estudos comprovaram a existência de depósitos de material amorfo localizados na superfície do tegumento (MA et al.; 2004) (Figura 2). Já foram descritos três tipos de depósitos de superfície nos tegumentos de sementes de soja. Os depósitos do tipo III são oriundos do endocarpo que fica aderido à semente (VAUGHAN et al., 1987). Fortes evidências apontam para o fato de que os depósitos do tipo II também possuem essa mesma origem (NEWELL e HYMOWITZ, 1978). Já a ontogênese dos depósitos do Tipo I é difícil de determinar, porém não se excluiu a possibilidade da camada paliçada contribuir para sua formação. Esses depósitos de superfície apresentam variações entre cultivares (MA et al. 2004).

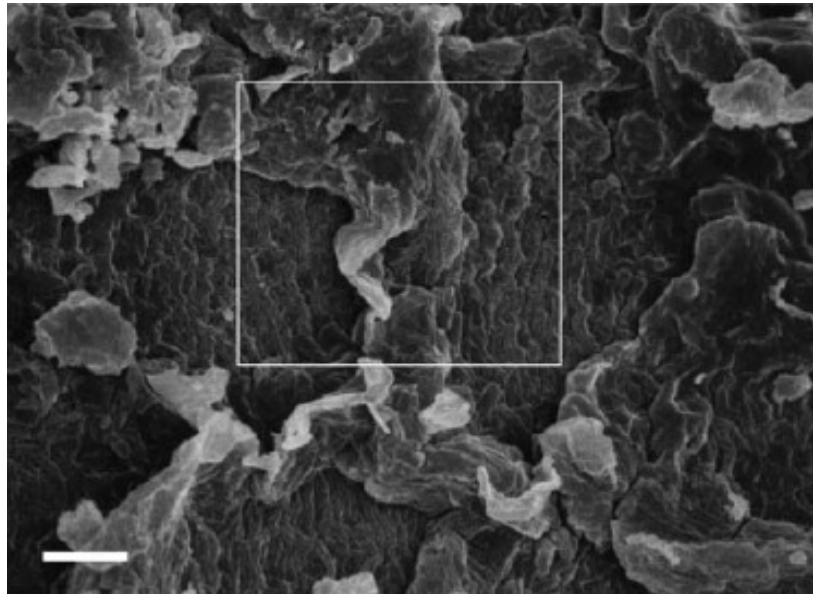


Figura 2. Depósitos de substâncias na superfície da cutícula do tegumento de sementes de soja. Fonte: Ma et al. (2004).

Em estudos conduzidos por Gijzen et al. (1999; 2003) uma proteína hidrofóbica foi detectada na superfície do tegumento de sementes de soja, sendo a quantidade dessa proteína relacionada à densidade dos depósitos presentes na superfície do tegumento.

Removendo-se esses compostos, é possível, observar ainda a presença de poros na superfície do tegumento, os quais podem apresentar as formas circular e alongada (PESKE e PEREIRA, 1983).

As principais funções do tegumento são: proteção do embrião contra danificações mecânicas e ataque de microorganismos, regulação da troca de gases entre o embrião e o ambiente externo e, em muitas espécies, participação no processo de dispersão das sementes. Outra importante função do tegumento é a regulação do intercâmbio de água. Em muitas famílias de plantas, o tegumento da semente atua como regulador da absorção de água (SOUZA e MARCOS FILHO, 2001). Segundo Peske e Pereira (1983), o número de poros presentes no tegumento



é um fator que pode influenciar a permeabilidade do tegumento das sementes de soja, sendo que sementes com menor número de poros tendem a apresentar maior resistência à absorção de água pelo tegumento.

A coloração do tegumento de sementes de soja pode apresentar variações. Três locos independentes ( $I$ ,  $R$  e  $T$ ) controlam a pigmentação do tegumento das sementes de soja. O loco  $I$  controla a distribuição de pigmentos, antocianinas e proantocianinas e corresponde a uma região multigênica contendo genes da família chalcona sintase (CHS). O alelo dominante  $I$  inibe a pigmentação fazendo com que o tegumento apresente coloração amarela enquanto que o alelo recessivo  $i$  promove a pigmentação das sementes (TODD e VODKIN, 1996). O alelo recessivo  $ii$  permite a coloração do tegumento da semente por completo enquanto que dois outros alelos,  $i^j$  e  $i^k$  restringem a pigmentação a algumas regiões do tegumento. Dessa forma tegumentos de sementes de soja com coloração podem ser preto ( $i$ ,  $R$ ,  $T$ ), preto imperfeito ( $i^k$ ,  $R$ ,  $t$ ), marrom ( $i$ ,  $r$ ,  $T$ ) ou camurça ( $i$ ,  $r$ ,  $t$ ), (ZABALA e VODKIN, 2003) (Figura 3).

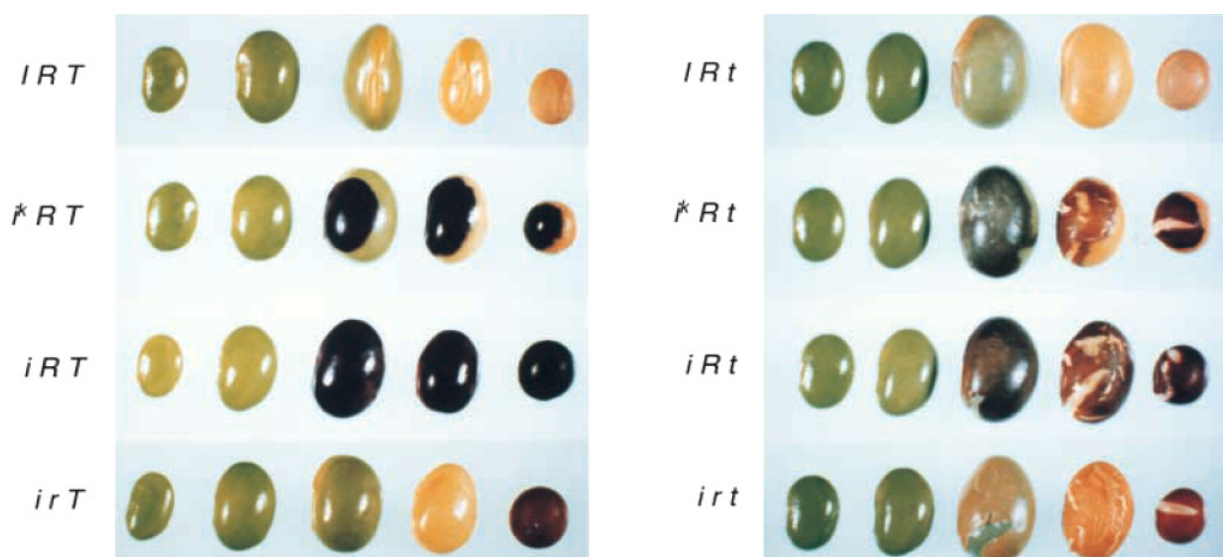


Figura 3. Coloração do tegumento de sementes de soja, controlada pelos locos ( $I$ ,  $R$  e  $T$ ).  $IRT$  e  $IRt$  (tegumento amarelo);  $i^k RT$  e  $i^k Rt$  (preto-imperfeito);  $i RT$  e  $i Rt$  (preto);  $ir T$  (marrom);  $irt$  (camurça). Fonte: Zabala e Vodkin (2003).

### **2.3. Propriedades do tegumento e sua relação com a qualidade de sementes**

A qualidade das sementes pode ser afetada por diversos fatores durante todo o processo de produção, iniciando pelos fatores genéticos; diferentes genótipos de uma mesma espécie podem apresentar maior ou menor vigor e longevidade. As adversidades ocorridas no desenvolvimento das sementes e após a maturidade fisiológica, expõem as sementes ao ataque de pragas e microorganismos, além disso, os processos de colheita, beneficiamento e armazenamento, também têm se revelado como os principais fatores na redução da qualidade das sementes.

Todos estes problemas que comprometem a qualidade fisiológica das sementes podem ser relacionados, de uma forma ou de outra, às características do tegumento das sementes. Em trabalho realizado por Carraro e Peske (2005), constataram que 95% dos lotes de sementes produzidos no estado do Paraná possuíam entre 2 e 20% de sementes com tegumento danificado e que pelo menos metade das sementes apresentavam mais de 10% desse dano. Além disso, verificaram que acima de 15% dos lotes apresentavam danos por umidade significando que as sementes permaneceram por muito tempo no campo, expostas a chuva, orvalho e outras adversidades, o que contribuiu para redução na qualidade fisiológica das mesmas.

Os genótipos de soja exibem diferenças para os caracteres do tegumento principalmente no que se refere ao teor de lignina e a permeabilidade a água. Sementes de soja com maior conteúdo de lignina apresentam menores índices de danificação mecânica (CARBONELL e KRZYZANOWSKI, 1995; ALVAREZ et al., 1997; CAPELETI et al., 2005). Em estudo conduzido por Carbonell e Krzyzanowski (1995), foi avaliada através do teste do pendulo, a resistência ao dano mecânico em

sementes de 12 cultivares de soja e os resultados obtidos demonstraram a existência de variabilidade genética para esse caráter. Tavares et al. (1987), afirmaram que tegumentos de sementes de soja com maior conteúdo de lignina apresentaram sementes com menor permeabilidade do tegumento e melhor qualidade fisiológica. Além disso, estudos conduzidos por (SANTOS et al., 2007), demonstraram que a expressão da cor marrom no tegumento das sementes, em uma mesma cultivar de soja, afetou positivamente a qualidade fisiológica das sementes e diminuiu a velocidade de embebição, o que pode ser parcialmente atribuído ao maior conteúdo de lignina desses tegumentos.

Cultivares comerciais de soja apresentam tegumento de coloração amarela, entretanto, existem genótipos que acumulam pigmentos na epiderme do tegumento resultando em sementes de coloração escura. A pigmentação do tegumento das sementes é correlacionada com a diminuição da velocidade de embebição. Em trabalhos conduzidos com diferentes espécies de Fabáceas, como *Pisum* sp. (WERKER et al., 1979), *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata* (LEGESSE e POWELL, 1996; ASIEDU e POWELL, 1998), observou-se que a coloração do tegumento é associada à permeabilidade, sendo que, sementes que acumulam pigmentos no tegumento apresentam menor velocidade de embebição em relação às não pigmentadas .

Sementes com tegumento semi-permeável são menos susceptíveis aos efeitos das flutuações de umidade e de temperatura do ar e conseqüentemente possuem maior resistência à deterioração a campo. Além disso, apresentam maior potencial de armazenamento, maior resistência aos danos mecânicos durante a colheita e menor índice de ocorrência de danos causados por percevejos (HEATHERLY et al., 1994).

Em estudos com sementes de soja, MA et al. (2004), relataram que a cutícula da camada paliçádica é fator determinante na permeabilidade do tegumento, sendo que a cutícula do tegumento permeável é mecanicamente frágil, desenvolvendo rachaduras durante a embebição, enquanto que no tegumento semi-permeável a cutícula é mecanicamente forte, não sofrendo rachaduras em condições normais.

Segundo Souza e Marcos-Filho (2001), nas Fabáceas o grau de permeabilidade do tegumento da semente parece estar associado ao comportamento de determinadas estruturas presentes na superfície do tegumento (hilo, micrópila, cor, cerosidade e porosidade), que influenciam o vigor, o potencial de armazenamento, os danos por embebição e a resistência a patógenos.

Sementes que apresentam tegumento de coloração preta se caracterizam por apresentar maior espessura da epiderme do tegumento (Figuras 4A e 4B), menores taxas de embebição, maior resistência a deterioração de campo, maior conteúdo de lignina e maior tolerância ao ataque de microorganismos (PESKE e PEREIRA, 1983; TAVARES et al., 1987; KUO, 1989; CHACHALIS e SMITH 2000; MERTZ et al., 2009).

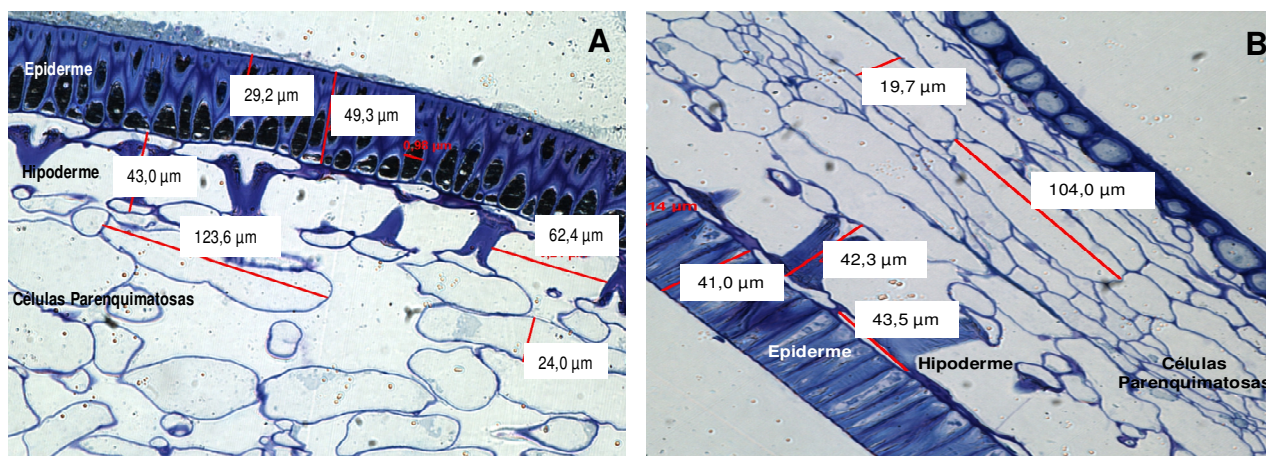


Figura 4. Corte transversal de tegumentos de sementes de soja aos 55 dias após a antese. A) Genótipo TP (tegumento preto) ; B) Cultivar CD 202 (tegumento amarelo). Fonte: Mertz et al. (2009).

De acordo com França Neto e Potts (1979), a inclusão das características de tegumento presentes nas sementes semi-permeáveis, em cultivares modernas e de boas características agronômicas, pode reduzir os índices de deterioração no campo, além de outras vantagens como aumento no potencial de armazenamento da semente (HEATHERLY et al., 1994), menores infestações de microorganismos e, possivelmente, menores níveis de danos causados pela debulha mecânica.

A característica tegumento semi-permeável pode ser utilizada nos programas de melhoramento de soja para ser incorporada às cultivares que apresentam atributos agronômicos de interesse, visando à qualidade fisiológica da semente. No entanto, há necessidade de caracterizar os genes ou as regiões genômicas envolvidas com o caráter.

#### **2.4. Expressão gênica diferencial pela técnica de cDNA-AFLP**

As respostas biológicas são controladas pela regulação precisa da expressão gênica. A identificação de um conjunto de genes diferencialmente expressos em uma determinada condição em relação à outra com a qual se deseja comparar, permite a compreensão dos diferentes processos envolvidos na manifestação de um determinado caráter.

Uma variedade de técnicas moleculares está disponível para a identificação global de genes diferencialmente expressos dentre as quais se destacam a amostragem diferencial (DDRT-PCR - *Differential Display Transcritase Reversa PCR* - LIANG e PARDEE, 1992), análise representativa das diferenças (RDA - *Representational Difference Analysis*, LISITSYN et al., 1993), análise serial da expressão gênica (SAGE - *Serial Analysis of Gene Expression*, VELCULESCU et al.,

1995), etiquetas de sequências expressas (ESTs – *Expressed Sequence Tag*, ADAMS et al., 1995), cDNA-AFLP (cDNA-AFLP - *cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphisms*, VOS et al., 1995 e BACHEM et al., 1996), hibridização subtrativa supressiva (SSH – *Supression Subtractive Hibridization*, DIATCHENKO et al., 1996) e microarranjos de DNA (“*Microarray*”, SCHENA et al., 1995).

A técnica de cDNA-AFLP (BACHEM et al., 1996) consiste na combinação da técnica de AFLP (VOS et al., 1995) com a utilização do cDNA. A síntese do cDNA é realizada com a enzima transcriptase reversa, uma enzima de origem viral que tem a capacidade de produzir uma molécula de DNA a partir da cópia de uma molécula de RNA mensageiro. Ou seja, como o nome diz, a transcriptase reversa faz o caminho contrário daquele percorrido pela RNA polimerase, que a partir de uma molécula de DNA produz RNA. A técnica de cDNA-AFLP consiste em quatro etapas. Na primeira o cDNA é clivado com enzimas de restrição. Na segunda, adaptadores específicos são ligados aos terminais dos fragmentos de cDNA gerados pela clivagem. Na terceira etapa, uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR utilizando iniciadores especificamente desenhados para reconhecer a sequência dos adaptadores. Na quarta e última etapa, a sub-população de fragmentos amplificados é separada em gel de alta resolução como, por exemplo, géis de poliacrilamida revelados com auto-radiografia ou coloridas com nitrato de prata (ZABEAU, 1993).

A primeira aplicação dessa técnica foi descrita por Bachem et al. (1996), que analisaram a expressão diferencial em batata. A identificação de genes relacionados a contrastes fenotípicos tem se mostrado extremamente eficiente através do isolamento de fragmentos de cDNA diferencialmente expressos fornecendo resultados confiáveis e reproduzíveis. Além disso, a principal vantagem dessa

técnica é o fato de que ela não necessita de prévio conhecimento da sequência e, dessa forma, é útil para a descoberta de genes ainda desconhecidos (BACHEM et al., 1996).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Produção do material vegetal e obtenção dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos**

Nesse estudo foram utilizados dois genótipos de soja contrastantes para as características de tegumento, CD 202 (tegumento amarelo, permeável e considerado suscetível à deterioração) e TP (tegumento preto, semi-permeável e mais resistente à deterioração).

O experimento foi instalado em casa-de-vegetação, as plantas foram cultivadas em condições homogêneas em vasos de plástico. Foram semeadas cinco sementes por vaso e após a emergência realizou-se o raleio deixando-se apenas duas plântulas por vaso. Para cada genótipo foram utilizadas quatro repetições de duas plantas, resultando em um total de dezesseis vasos por genótipo.

A partir da antese iniciou-se a marcação de flores para que todas as sementes amostradas estivessem no mesmo estágio de desenvolvimento. Foram realizadas sete amostragens em intervalos de cinco dias (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 dias após a antese) (Figuras 5 e 6). Assim que colhidas, as sementes foram colocadas imediatamente no gelo e transportadas até o Laboratório de Biossementes (FAEM/UFPel), onde os tegumentos foram separados das sementes



com auxílio de lâminas esterilizadas, tomando-se o cuidado de manter o tecido vegetal puro, ou seja, sem nenhum resquício de cotilédone ou qualquer outro tecido que não fosse tegumento. Esse material permaneceu estocado a temperatura de -80°C até o momento da extração do RNA (MERTZ, 2007; MERTZ et al., 2009).

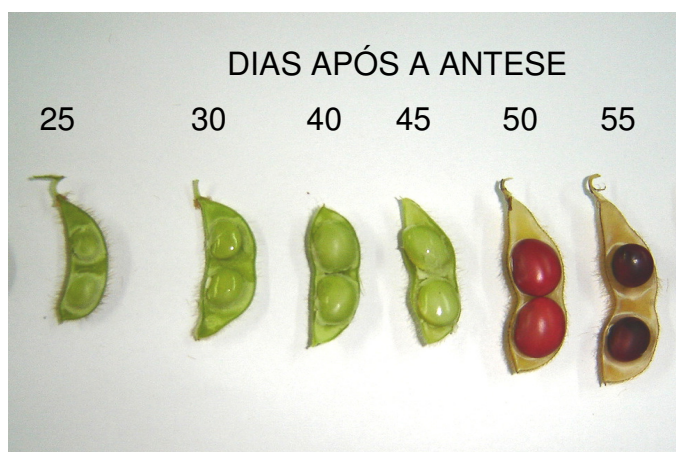


Figura 5. Tegumento de sementes de soja do genótipo TP em diferentes fases de desenvolvimento.

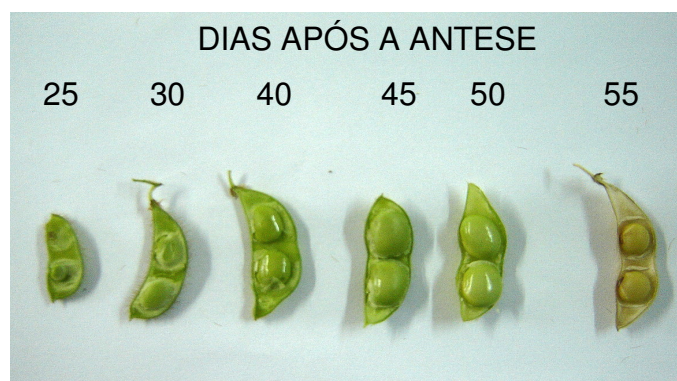


Figura 6. Tegumento de sementes de soja do genótipo CD 202 em diferentes fases de desenvolvimento.

O RNA total foi extraído utilizando o reagente *Pure Link Plant RNA* (Invitrogen) (Figuras 22 e 23 - Anexos). Realizou-se primeiramente o tratamento de todas as vidrarias, cadinhos, pistilos e demais utensílios necessários com água

contendo 0,01% de dietilpirocarbonato (H<sub>2</sub>O DEPC), para evitar a ação de RNases. A extração foi realizada separadamente para cada época de amostragem. Antes da síntese do cDNA dupla-fita, aproximadamente 7µg de RNA total provenientes de cada uma das épocas de coleta foram misturadas compondo a amostra de RNA utilizada na síntese do cDNA (MERTZ et al., 2009).

Em seguida, realizou-se a síntese do cDNA dupla-fita e partiu-se para análise da expressão diferencial dos genes do tegumento através da técnica de cDNA-AFLP. Através dessa técnica foi possível identificar 47 fragmentos de cDNAs diferencialmente expressos entre esses genótipos utilizando as seguintes combinações de iniciadores: *EcoRI-ACC/MseI-CTC*, *EcoRI-ACT/MseI-CAT*, *EcoRI-ACG/MseI-CTT*, *EcoRI-AGC/MseI-CAC*, *EcoRI-AGC/MseI-CTC*, *EcoRI-AGG/MseI-CTG*, *EcoRI-AAG/MseI-CTC* e *EcoRI-AGG/MseI-CTC* (Figuras 24 e 25- Anexos). Desses 47 cDNAs, 25 eram provenientes do genótipo TP e 22 do genótipo CD 202. Esses fragmentos foram resgatados do gel e armazenados a temperatura de -80 °C para posterior purificação.

### **3.2. Resgate e purificação das bandas selecionadas**

Fragmentos de cDNA presentes como bandas fortes apenas no genótipo TP foram recortados do gel com auxílio de lâminas. Os fragmentos de gel foram imersos em 20µL de água ultrapura permanecendo em banho de gelo, por um período de 10 minutos. As amostras foram aquecidas a 95°C por 15 minutos e em seguida, resfriadas novamente no gelo. Após uma centrifugação breve, o sobrenadante foi removido para ser utilizado na reação de reamplificação. A reação de reamplificação foi realizada utilizando-se 5µL do DNA recuperado e um volume final de reação de

20µL de reação utilizando as mesmas combinações de iniciadores do *Kit AFLP Starter Primer* (Invitrogen), das quais se originaram as bandas polimórficas. Para cada banda resgatada foram adicionados os seguintes componentes:

**Mix 1:** 0,5µL do iniciador *EcoR* I (27,8ng/µl)  
+  
4,5µL do iniciador *Mse* I (6,7ng/µl, dNTPs)  
Total = 5,0µL

**Mix 2:** 7,9µL de água ultrapura  
+  
2,0µL de tampão PCR10X (Tris-HCl (pH 8,4) 200mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM, KCl 500mM)  
0,1µL de *Taq* DNA Polimerase (5u/µL)  
Total = 10µL

**Mix 3:** 5,0µL de cDNA diluído  
+ 5,0µL de *mix 1*  
10,0µL de *mix 2*  
Total = 20µL

As condições de reação foram efetuadas seguindo as recomendações descritas pelo *Kit*.

### 3.3. Clonagem dos fragmentos de cDNA reamplificados

#### 3.3.1. Preparo de células competentes

Preparo do pré-inoculo: nessa etapa inoculou-se uma colônia isolada de *Escherichia coli* designadas de (TOP 10F) em 10mL de meio líquido LB contendo (10g de triptona, 5g de extrato de levedura, 5g de NaCl, completando-se para 1L de

água ultra pura até dissolver e posteriormente autoclavando a 121°C por 15 minutos).

Na manhã seguinte 10mL do pré-inoculo foram adicionados a 500mL de meio LB. As células competentes foram mantidas em agitação a 225-250g em temperatura de 37°C por um período de aproximadamente 2 horas, realizando aferições em espectrofotômetro periodicamente até atingirem  $DO_{600}$  (Densidade Ótima) = (0,5-0,7). Após atingir esses parâmetros os tubos foram resfriados em banho de gelo por 10 minutos e centrifugados a 4.000g por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi eliminado e o precipitado obtido ressuspendido em água gelada esterilizada e novamente centrifugado conforme descrito acima.

Finalmente ressuspendeu-se o sobrenadante em 0,5mL de glicerol 10% e utilizou-se as células competentes na reação de transformação.

### **3.3.2. Reação de ligação**

Os fragmentos de cDNA reamplificados foram clonados utilizando o vetor *pCR 2.1 TOPO*, do *Kit TOPO TA Cloning Kit for Sequencing* (Invitrogen) (Figura 4). A reação de ligação foi efetuada adicionando-se 1µL de solução salina diluída 1:4, 0,5µL cDNA, 0,5µL do vetor, completou-se com água ultrapura até volume final de 5,5µL.

### **3.3.3. Transformação por eletroporação**

A transformação foi efetuada através de eletroporação em células competentes de *E. coli* Top 10 F produzidas conforme descrito no item 3.3.1.

Acrescentou-se 2 $\mu$ L da solução de ligação em uma alíquota de 70 $\mu$ L de células competentes. Colocou-se a amostra no eletroporador ajustado a 25 $\mu$ F (capacitância), 200 $\Omega$  (resistência), 2,5KV (voltagem). Acrescentou-se 1mL de meio LB e incubou-se no agitador por 1h a 37°C. Acrescentou-se o cultivo em 2 placas (uma com 50 $\mu$ L e outra com 950 $\mu$ L do cultivo), cada placa contendo 20mL de LB sólido, 20 $\mu$ L de Kanamicina (50mg/mL), 40 $\mu$ L de X-gal (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside*) (20mg/mL) e 20 $\mu$ L de IPTG (*Isopropyl-beta-thio galactopyranoside*) (0,3 Molar). Posteriormente incubaram-se as placas em câmara BOD 37°C.

#### 3.3.4. Seleção das colônias transformadas

Na manhã seguinte, efetuou-se a seleção das colônias transformadas através da visualização da coloração, sendo as colônias brancas as que possuíam o fragmento de interesse e as colônias azuis as que não continham o inserto (Figura 7).

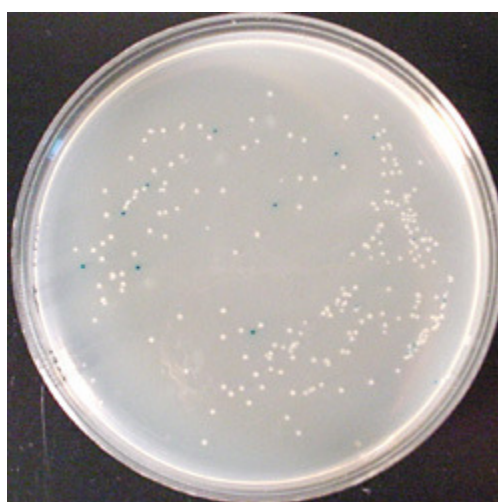


Figura 7. Colônias recombinantes em fragmentos de cDNA clonados no vetor *pCR 2.1 TOPO*. Colônias azuis (não recombinantes/sem fragmento), colônias brancas (recombinantes/com fragmento).

Foram selecionadas três colônias brancas de cada amostra e uma colônia azul (controle). A cada colônia foram acrescentados 3mL de meio LB com antibiótico (1μL Kanamicina/1mL de LB). Incubou-se no agitador a 37°C e posteriormente realizou-se a extração do DNA plasmidial.

### **3.3.5. Extração do DNA plasmidial**

O DNA plasmidial foi extraído com a utilização do *FlexiPrep™ Kit* (GE Healthcare).

- Transferiu-se 1,5mL de uma cultura mantida em agitação até o dia seguinte para um tubo de microcentrífuga e centrifugou-se por 30s a 14.000g;
- Removeu-se o sobrenadante (retirando o excesso com a pipeta) sem danificar o precipitado;
- Ressuspendeu-se o precipitado em 200μL de solução I (Tris-HCl (pH 7,5) 100mM, EDTA10mM, RNase I 400μg/mL) em agitador;
- Adicionou-se 200μL de solução II (NaOH 1M, SDS 5,3%(peso/volume)) e inverteu-se o tubo 10 a 15x;
- Adicionou-se 200μL de solução III (Potássio 3M, solução de acetato 5M) e inverteu-se o tubo imediatamente por 10 a 15x;
- Centrifugou-se a 14.000g por 5 minutos;
- Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo;
- Adicionou-se 420μL de isopropanol misturando bem e incubou-se a temperatura ambiente por 10 minutos;
- Centrifugou-se por 10 minutos e desprezou-se o sobrenadante e deixou-se o precipitado secar;

- Adicionou-se 150µL de *Sephaglas* invertendo o tubo por 1 minuto para dissolver o precipitado;
- Centrifugou-se a 14.000g por 15 segundos e removeu-se o sobrenadante sem danificar o precipitado;
- Lavou-se o precipitado adicionando 200µL solução de lavagem (Tris-HCl (pH 7,5) 20mM, EDTA 2mM, NaCl 200mM, etanol 60%). Agitou-se gentilmente para ressuspender o precipitado;
- Centrifugou-se por 15 segundos a 14.000g e removeu-se o sobrenadante sem danificar o precipitado;
- Adicionou-se 300µL de etanol 70% agitando gentilmente para ressuspender o precipitado. Centrifugou-se por 15 segundos e removeu o sobrenadante;
- Ressuspendeu-se o precipitado agitando com a mão. Incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente para secar;
- Adicionou-se 50µL de TE 1X e agitou-se com as mãos. Incubou-se por 5 minutos a temperatura ambiente, agitando o tubo com as mãos periodicamente;
- Centrifugou-se por 1 minuto a 14.000g e transferiu-se o sobrenadante para um tubo limpo.
- As amostras de DNA foram visualizadas através de eletroforese em gel de agarose 0,7% (5µL por amostra).

### **3.3.6. Digestão do DNA com enzimas de restrição**

Após a extração do DNA plasmidial, as amostras foram digeridas com as enzimas de restrição *Xba* I e *Hind* III (Figura 8). Comparou-se o tamanho dos

insertos liberados nas colônias brancas com os respectivos controles (colônias azuis), a fim de verificar se a ligação foi efetuada com sucesso.

A reação de digestão foi efetuada adicionando-se os seguintes componentes:

- DNA: 10 $\mu$ L
- Tampão de reação 10X: 2 $\mu$ L
- Água ultrapura: 7 $\mu$ L
- Enzima de restrição *Xba* I (10u/ $\mu$ L): 0,5 $\mu$ L
- Enzima de restrição *Hind* III (10u/ $\mu$ L): 0,5 $\mu$ L
- Volume final: 20 $\mu$ L

As amostras permaneceram incubadas a temperatura de 37°C até a manhã seguinte e posteriormente foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 2%.



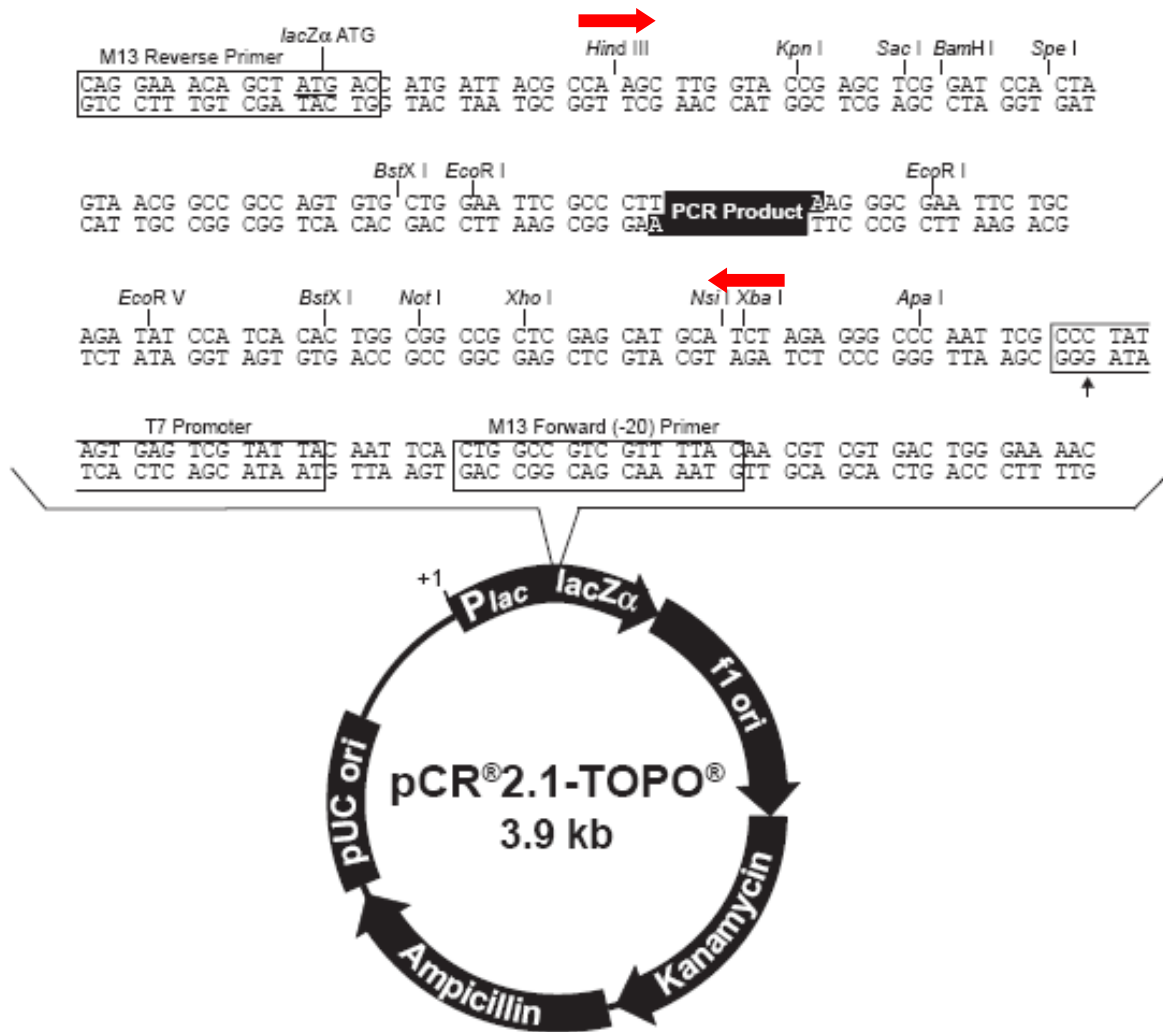


Figura 8. Mapa do vetor *pCR 2.1 TOPO*, utilizado para clonagem dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos entre os tegumentos de sementes de soja de coloração preta e amarela. As setas indicam os sítios de restrição das enzimas *Xba* e *Hind III*, utilizadas para digestão do DNA plasmidial.

### 3.4. Sequenciamento dos fragmentos de cDNA

O sequenciamento das amostras foi realizado em equipamento *MegaBACE 500 DNA sequencer* (GE Healthcare) utilizando a tecnologia *Dynamic ET-terminator*. Ambas as extremidades da fita foram sequenciadas utilizando-se três repetições de leitura. As reações de sequenciamento foram efetuadas com a utilização dos iniciadores M13 no sentido senso e anti-senso, os quais conforme observado na

figura 8, apresentam sítio de anelamento próximo à região de inserção do fragmento de interesse.

### 3.5. Análise *in silico*

Primeiramente realizou-se o tratamento das sequências utilizando o programa *VecScreen* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>), afim de remover parte das sequências pertencentes ao vetor. Em seguida, com auxílio do programa *ContigExpress® Vector NTI 10.0 suite* (Invitrogen), as repetições senso e anti-senso do sequenciamento de cada uma das amostras foram agrupadas em *contigs* conforme observado na figura 9.

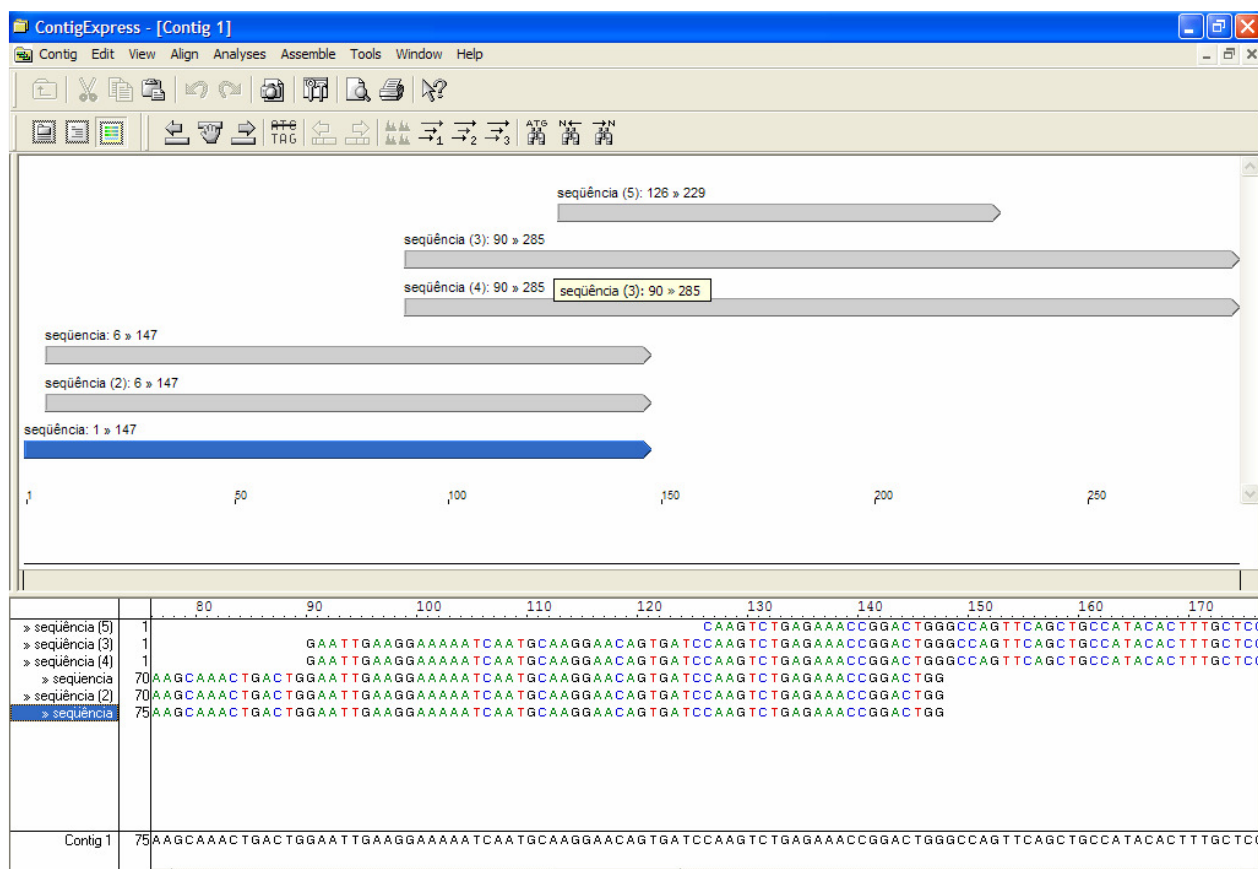


Figura 9. Agrupamento das repetições das leituras do sequenciamento no sentido senso e anti-senso dos cDNAs expressos em tegumentos de sementes de soja de coloração preta, analisadas pelo programa *ContigExpress® Vector NTI 10.0 suite* (Invitrogen).

Posteriormente as sequências contíguas de cada fragmento de cDNA foram comparadas com genes/proteínas depositadas em bancos de dados. Para a busca de similaridade entre as sequências de cDNA e as sequências depositadas nos bancos de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), SoyBase (<http://www.soybase.org/>), e EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) foi utilizada a estratégia do alinhamento local através do programa computacional *BLAST* (ALTSCHUL et al., 1990). A seleção das sequências similares foi baseada na estatística *E-value*, a qual calcula a probabilidade de que o alinhamento entre sequências tenha ocorrido ao acaso. Para este estudo foi considerado um ponto de corte rigoroso, com valores de *E-value* inferiores a  $1e^{-10}$ .

Após identificar as sequências de genes/proteínas que apresentaram similaridade com as sequências de cDNA oriundas do genótipo com tegumento preto, realizou-se um alinhamento global entre as sequências depositadas nos bancos de dados e as sequências encontradas nesse trabalho, afim de detectar a ocorrência de blocos conservados e a ocorrência de mutações do tipo inserções/deleções (*INDELS*) ou polimorfismo de nucleotídeo simples (*SNPs*). Para isso, utilizaram-se associados os programas *ClustalW* (THOMPSON et al., 1994) e o programa *BioEdit* 7.0.0. (HALL, 1999).

As sequências de cDNA que apresentaram mutações em relação as sequências correspondentes das bases de dados foram traduzidas em aminoácidos através da utilização do programa *ExpASy - Translate tool* ([www.expasy.ch/tools/dna.html](http://www.expasy.ch/tools/dna.html)) e novamente alinhadas pelos programas *ClustalW* (THOMPSON, et al., 1994) e *BioEdit* version 7.0.0. (HALL, 1999), para verificar se as alterações nos nucleotídeos resultaram em alterações na sequência de aminoácidos das proteínas.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Clonagem dos fragmentos de cDNA

Dos 25 fragmentos provenientes do genótipo com tegumento preto, 17 foram reamplificados em concentração adequada para realização da clonagem (Figura 10). Nas demais amostras, a reação de reamplificação não resultou em bandas definidas.

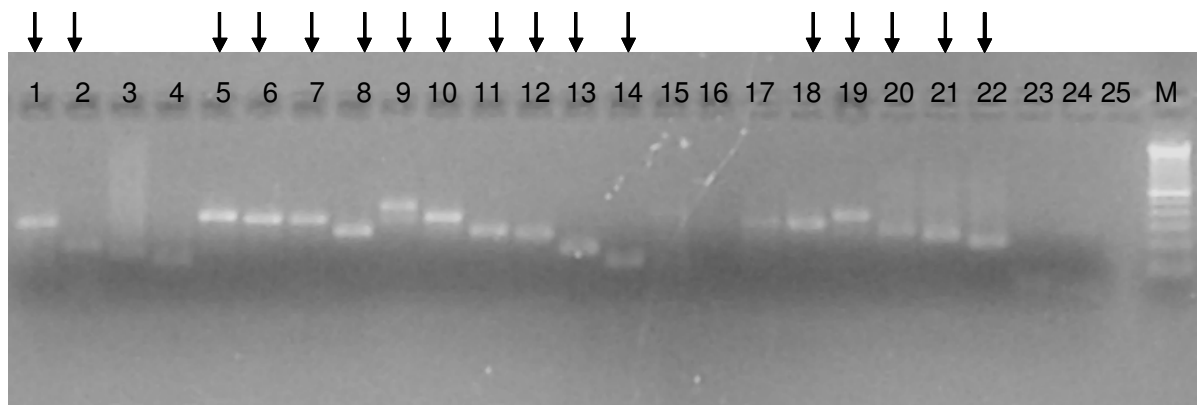


Figura 10. Bandas polimórficas oriundas da técnica de cDNA-AFLP, resgatadas do gel de poliacrilamida e reamplificadas. M – marcador de peso molecular 1Kb. Gel de agarose 2%. Setas indicam fragmentos resgatados e reamplificados.

Os 17 fragmentos reamplificados foram clonados com sucesso (Figura 11), entretanto devido ao pequeno tamanho dos fragmentos clonados, não se pôde observar diferença entre as amostras provenientes dos controles (colônias azuis) e as amostras em que houve a clonagem dos fragmentos de interesse (colônias brancas). Nesse caso, realizou-se a digestão das amostras com as enzimas de restrição *Xba* I e *Hind* III a fim de comparar o tamanho dos insertos liberados em cada uma das amostras.

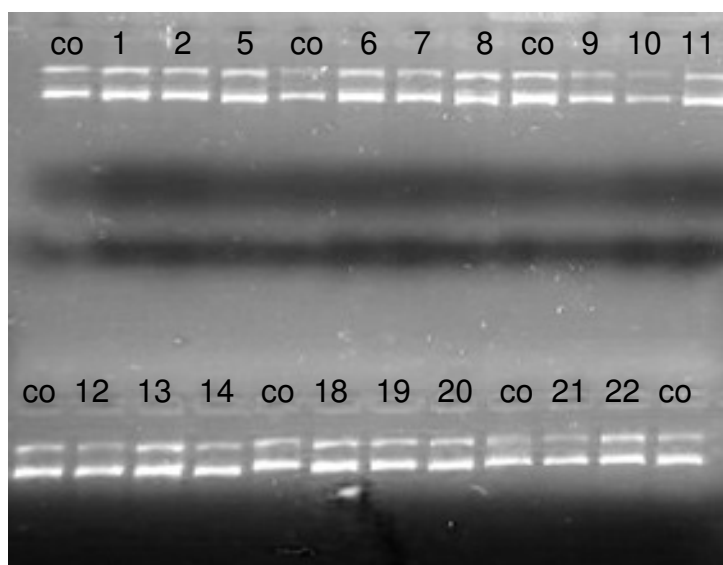


Figura 11. DNA plasmidial extraído de colônias recombinantes utilizando o *FlexiPrep™ Kit* (GE Healthcare) e visualizado em gel de agarose 0,7%. CO – controle.

Após a digestão do DNA recombinante comparou-se o tamanho dos fragmentos liberados nas amostras provenientes de colônias brancas, com as amostras controle. Em cinco (6, 10, 19, 21 e 22) das 17 amostras analisadas observou-se problema na reação de digestão, pois nenhum inserto foi liberado (Figura 12). Nas demais amostras, confirmou-se o sucesso da clonagem dos fragmentos de interesse, pois as bandas oriundas das amostras em que houve a inserção dos fragmentos foram maiores em relação as da amostra controle.

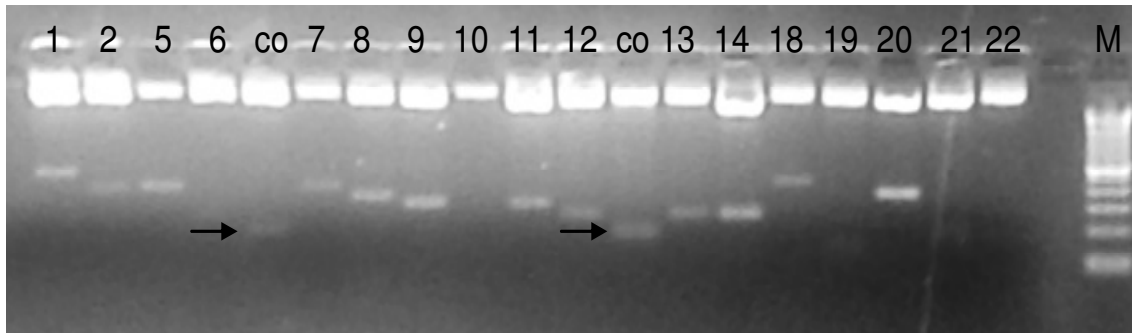


Figura 12. Amostras de DNA recombinante digeridos com enzimas de restrição *Xba* I e *Hind* III. Bandas 1 a 22 – Fragmentos clonados oriundos da técnica de cDNA-AFLP. CO – Controle (DNA plasmidial sem inserto). Gel de agarose 2%.

Após repetir a digestão nas amostras que apresentaram problema, verificou-se a presença de bandas. Como nas demais amostras analisadas, os fragmentos liberados nas amostras com o DNA recombinante foram maiores em relação ao controle, que mesmo aparecendo em baixa concentração, ainda assim, possibilitou a comparação (Figura 13).

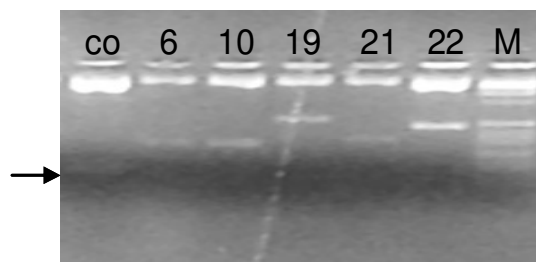


Figura 13. Repetição da digestão das amostras de DNA recombinante, digeridos com as enzimas de restrição *Xba* I e *Hind* III. CO – Controle (DNA plasmidial sem inserto). Gel de agarose 2%.

## 4.2. Identificação da possível função dos genes através de análise *in silico*

O tamanho das seqüências contíguas formadas através do agrupamento entre as repetições das leituras do sequenciamento no sentido senso e anti-senso de cada uma das amostras, variou entre 130 a 270pb (pares de bases), o que é considerado um tamanho satisfatório para busca por similaridade nos bancos de dados contendo seqüências de DNA.

A Tabela 1 apresenta os genes que foram correlacionados as seqüências de cDNA obtidas nesse estudo. Das 17 seqüências oriundas da técnica de cDNA-AFLP, sete apresentaram similaridade com genes presentes em bancos de dados (Tabela 1). As demais amostras, não alinharam com nenhuma seqüência conhecida. Algumas dessas proteínas identificadas apresentam relação direta com características do tegumento de sementes de soja e podem auxiliar na compreensão das diferenças fenotípicas existentes entre os tegumentos de sementes de soja com coloração preta e amarela.

Uma das seqüências apresentou similaridade com a enzima flavonóide 3`-hidroxilase (F3`H), a qual é codificada pelo gene denominado gene *TT7* (MOÏSE et al., 2005). Essa proteína tem relação com a coloração do tegumento e também com a sua integridade estrutural. Flavonóides são metabólitos secundários acumulados nas sementes da maioria das espécies e estão envolvidos em funções fisiológicas como dormência e viabilidade. A maior parte dos flavonóides em sementes são antocianinas, flobatênicos, isoflavonas e proantocianidinas (PAS, também chamados taninos condensados) (LEPINIEC et al., 2006). O gene da flavonóide 3`-hidroxilase em soja corresponde ao loco *T* em soja, o qual afeta a coloração da pubescência da planta e a coloração do tegumento da semente, bem como a integridade estrutural

do tegumento da semente e a tolerância a baixas temperaturas. (TAKAHASHI e ASANUMA, 1996; TAKAHASHI, 1997; TODA et al., 2002, ZABALA e VODKIN, 2003).

Outra sequência foi similar a uma proteína arabinogalactana (*fasciclin-like arabinogalactan proteins* - FLAs), uma sub-classe das proteínas arabinogalactanas (AGPs). Proteínas FLAs são envolvidas na regeneração da parede celular durante a cultura de protoplastos em algodão (YANG, et al., 2008), elas participam na síntese de parede celular secundária, no metabolismo dos carboidratos e na biossíntese de lignina (FRIEDMANN, 2006). A expressão de proteínas FLAs precedem a lignificação de células do esclerênquima sugerindo que as essas proteínas podem desempenhar um papel como componente da parede celular secundária (ITO et al., 2005).

A lignina do tegumento de sementes de soja desempenha importante papel para manutenção da qualidade física e fisiológica das sementes (ALVAREZ et al., 1997; CAPELETI, 2005). Sementes com tegumento escuro possuem maior conteúdo de lignina em relação as sementes com coloração amarela (TAVARES et al., 1986; SANTOS, 2007). O estudo das proteínas FLAs pode explicar o maior conteúdo de lignina presente em sementes de soja com coloração preta.



Tabela 1. Proteínas que apresentaram similaridade com sequências de cDNA diferencialmente expressas entre tegumentos de sementes de soja de coloração preta e amarela.

<b>Número de Acesso</b>	<b>Espécie</b>	<b>Nome do gene</b>	<b>Proteína/ Produto do gene</b>	<b>e- value</b>	<b>Função</b>
ABW69385	<i>Glycine max</i> cultivar Willians	<i>F3'H TT7</i>	Flavonóide 3'-hidroxilase	1e <sup>-51</sup>	Coloração da pubescência; coloração do tegumento da semente e integridade estrutural do tegumento.
ABV27485.1	<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>FLA14</i>	Arabinogalactana ( <i>Fasciclin-like arabinogalactan protein</i> )	2e <sup>-60</sup>	Proteína estrutural presente em células da parede vegetal; biossíntese de lignina.
U26457.1	<i>Glycine max</i>	<i>v1xC</i>	Lipoxigenase	1e <sup>-27</sup>	Defesa contra patógenos.
CD391498	<i>Glycine max</i>	_	Proteína induzida por ácido salicílico	1e <sup>-94</sup>	Defesa contra patógenos.
ACG70968.1	<i>Ziziphus jujuba</i>	<i>CyP</i>	Ciclofilina	3e <sup>-26</sup>	Induzido em resposta a vários tipos de estresses bióticos e abióticos.
ABE86663.2	<i>Medicago truncatula</i>	<i>MtrDRAFT_AC16</i> <i>1864g30v2</i>	Proteína com domínio dedo de zinco ( <i>Zinc finger, RING-type</i> )	1e <sup>-09</sup>	Fator de transcrição, indução de dormência em sementes mediada por ABA.
ABD72481.1	<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>TCP gene</i>	Proteína com domínio TCP ( <i>T-complex protein</i> )	7e <sup>-80</sup>	Divisão celular e crescimento de órgãos em plantas.

Três sequências de cDNAs que apresentaram-se diferencialmente expressas em tegumentos de sementes de soja de coloração preta foram similares a proteínas envolvidas na defesa contra patógenos como lipoxinase, ciclofilina e uma proteína induzida por ácido salicílico. Como descrito em alguns estudos, o tegumento da semente de soja é uma estrutura envolvida na resistência a infecção por pragas e microorganismos. Cultivares de soja com tegumento semi-permeável apresentaram menor infecção por *Phomopsis phaseoli* em comparação com tegumentos permeáveis (KULIK e YAKLICH, 1991). A família das lipoxigenases (LOX) tem significativo papel nas interações planta-microorganismos. Em patógenos de sementes, alguns trabalhos indicam que as LOX atuam inibindo a germinação de esporos de fungos do gênero *Aspergillus* em sementes de milho (DOEHLERT et al., 1993; ZERINGUE et al., 1996). Segundo trabalho conduzido por Wilson et al., (2001) uma 9-LOX é super-expressa durante a infecção de sementes por *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*. Em relação ao ácido salicílico, ele é um importante regulador na indução de resistência de plantas contra patógenos. As plantas transgênicas deficientes no acúmulo de ácido salicílico não foram eficientes na resposta de defesa contra patógenos após a infecção, demonstrando a importância do ácido salicílico resistência local adquirida (LAR) e na resistência sistêmica adquirida (SAR) (STICHER et al., 1997). Quanto às proteínas ciclofilinas, de acordo com Romano et al. (2004) é uma grande família de genes presentes em todas as espécies de plantas, com 29 membros em *Arabidopsis thaliana*. Uma característica marcante dos genes de proteínas ciclofilinas de plantas é que a sua expressão é induzida em resposta a diferentes estresses abióticos ou patogênicos (GODOY et al., 2000; KONG et al., 2001).

A sexta sequência de cDNA foi similar a uma proteína caracterizada por apresentar um domínio dedo de zinco, uma importante classe de fatores de transcrição em eucariotos. A maioria dos sistemas de transdução de sinais celulares são mediados por um complexo sistema onde as proteínas de membrana celulares IP3 (*inositol 1,4,5 - trisphosphate*) são responsáveis pelo controle de diversos aspectos fisiológicos. Parte de transdução de sinais em resposta a estresses bióticos e abióticos, como o acúmulo de ácido abscísico (ABA), passam por esta via (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997). Uma interação entre proteínas com domínio dedo de zinco e os fosfatidilinositol foi descrito por Kaadige e Ayer (2006), e podem ajudar a explicar a relação entre essas proteínas e as diferenças fenotípicas em sementes. Esta associação foi verificada em plantas de *Arabidopsis* em diferentes respostas à dormência das sementes mediada pela ABA, onde se observou diferenças significativas na expressão de proteínas com domínio dedo de zinco (HE e GAN, 2004).

Em relação às proteínas da família com domínio TCP (*T - complex protein*), incluem fatores de transcrição como TB1 (*Teosinte Branched 1*), CYC (*Cycloidea*), identificados em *Zea mays*, *Antirrhinum* e *Oryza sativa*, respectivamente (CUBAS et al., 1999; LUO et al., 1996; DOEBLEY et al., 1995). Em geral, muitos estudos indicam que os genes da família TCP são responsáveis pelo estímulo ou supressão da divisão meristemática em tecidos celulares e/ou do crescimento de órgãos vegetais, quando são expressos em diferentes níveis (LI et al., 2005; KEBROM et al., 2006). Outros resultados podem explicar a ocorrência diferencial de transcritos correspondentes a esses genes em nossos resultados, no entanto, os presentes resultados não permitem uma relação entre esta proteína e as características avaliadas neste trabalho.

A técnica de AFLP tem algumas limitações, pois se baseia na amplificação aleatória de fragmentos. A existência de mapas de ligação relacionados ao caráter em estudo possibilitaria o posicionamento desses marcadores AFLP ao longo dos cromossomos da soja, superando parcialmente as limitações dessa classe de marcadores. Entretanto, até o momento, essas informações ainda não se encontram disponíveis.

Além disso, algumas bandas obtidas no genótipo TP através da técnica de cDNA-AFLP apresentaram baixa intensidade impossibilitando a reamplificação desses fragmentos. Neste caso, é possível que alguns genes envolvidos com características do tegumento de sementes de soja não tenham sido identificados.

No entanto, nesse estudo, foi possível identificar algumas proteínas presentes no genótipo com tegumento preto que têm relação direta com propriedades do tegumento de sementes de soja. O estudo destes genes por PCR em tempo real e análise de *Northern blot* pode confirmar os resultados obtidos neste trabalho. Além disso, o isolamento desses genes e seus diferentes alelos em genótipos com características do tegumento contrastantes podem indicar quais genes e/ou alelos devem ser transferidos para as cultivares comerciais de soja.

#### **4.3. Identificação de mutações entre as sequências similares através de alinhamento global**

Nas figuras 14 a 21 encontram-se os alinhamentos realizados entre as sequências de cDNAs obtidas nesse estudo e as sequências que encontram-se depositadas em bancos de dados.

As sequências relacionadas a proteína arabinogalactana (*fascilin-like arabinogalactan protein*) e a proteína com domínio TCP (*T-complex protein*) são oriundas da espécie *Gossypium hirsutum*, e como se pode observar nas figuras 14 e 15 o trecho em que ocorreu o pareamento apresentou alinhamento perfeito, sem ocorrência de INDELS ou SNPs demonstrando que a sequência manteve-se conservada nesse trecho, mesmo tratando-se de espécies diferentes. O mesmo pode ser afirmado em relação à proteína com domínio dedo de zinco oriunda da espécie *Medicago truncatula* (Figura 16) e a proteína ciclofilina oriunda da espécie *Ziziphus jujuba* (Figura 17).

No caso das sequências correspondentes a proteína induzida por ácido salicílico (Figura 18) e da flavonóide 3`hidroxilase (Figura 19), são oriundas da espécie *Glycine max*, a mesma utilizada nesse trabalho. Entretanto, uma particularidade que deve ser ressaltada é o fato de que a sequência de flavonóide 3`hidroxilase depositada no banco de dados é oriunda da cultivar Williams (ZABALA e VODKIN, 2003), a qual se caracteriza por apresentar caracteres semelhantes ao genótipo TP utilizado nesse trabalho, ou seja, tegumento de coloração preta, pubescência marrom e hilo marrom.

Com relação à enzima lipoxigenase (Figura 20), a análise do alinhamento múltiplo entre a sequência de lipoxigenase da soja com tegumento amarelo depositada em banco de dados e a sequência obtida nesse trabalho, mostrou um número expressivo de alterações na sequência de nucleotídeos. Essa sequência foi traduzida em aminoácidos e comparada com a sequência da proteína depositada no banco de dados a fim de verificar se são mutações silenciosas ou mutações que promovem alteração na composição da proteína.

O alinhamento ocorreu em um trecho correspondente a 90 aminoácidos (Figura 21). Dentro dessa região, houve alteração em 13 aminoácidos conforme indicado na tabela 2.

Tabela 2. Alteração na composição de aminoácidos da proteína lipoxigenase expressa em tegumentos de sementes de soja de coloração preta. Cores diferentes representam os grupos classificados em função do radical. Vermelho (Apolar), azul (polar neutro), preto (póla ácido), verde (polar básico).

Alteração Aminoácido		Alteração do códon	
NCBI*	cDNA	NCBI*	cDNA
S serina (Ser)	K lisina (Lys)	UCA	AAG
k lisina (Lys)	R arginina (Arg)	AAG	AGG
N asparagina (Asn)	S serina (Ser)	AAC	AGC
A alanina (Ala)	T treonina (Thr)	GCA	ACU
E ácido glutâmico (Glu)	G glicina (Gly)	GAA	GGA
T treonina(Thr)	N asparagina (Asn)	ACA	AAU
Q glutamina (Gln)	A alanina (Ala)	CAG	GCA
N asparagina (Asn)	S serina (Ser)	AAU	AGU
K lisina (Lys)	R arginina (Arg)	AAA	AGA
S serina (Ser)	N arparagina (Asn)	AGC	AAC
H histidina (His)	T treonina(Thr)	CAU	ACU
M metionina (Met)	L leucina (Leu)	AUG	UUG
S serina (Ser)	T treonina(Thr)	AGU	ACU

\* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Dos 13 aminoácidos modificados oito foram substituídos por aminoácidos pertencentes ao mesmo grupo (tabela 2). Dois foram substituições do grupo polar neutro para o grupo polar básico ou vice-versa (Ser-Lys e His-Thr), dois aminoácidos do grupo apolar foram substituídos por aminoácidos do grupo polar neutro ou vice-versa (Ala-Thr e Gln-Ala) e um aminoácido polar ácido foi substituído por outro do

grupo polar neutro (Glu-Gly). Essas modificações podem provocar alterações na estrutura tridimensional da proteína e conseqüentemente a sua função catalítica (BUCHANAN et al., 2000; MALONE et al., 2008). Os efeitos fenotípicos dessas mutações são tanto ou mais drásticos quanto maior for a diferença na natureza química das cadeias laterais dos resíduos dos aminoácidos, como por exemplo, a substituição de um aminoácido hidrofílico (polar) por um aminoácido com cadeia lateral do resíduo hidrofóbica (apolar), isso ocorreu quando houve a substituição da Glutamina pela Alanina – (Gln – Ala), ou ainda, quando a substituição resulta na inversão da carga elétrica do resíduo, nesse estudo ocorreu a substituição ácido glutâmico pela glicina - (Glu - Gly), ou seja, de um aminoácido ácido com carga negativa por um aminoácido neutro sem carga.

Conforme descrito no item 4.2, as enzimas lipoxigenases têm papel importante nas reações de defesa contra patógenos, existindo trabalhos que relatam a sua atuação inibindo a infecção de fungos em sementes (DOEHLERT et al., 1993; ZERINGUE et al., 1996). Estudos afirmam que sementes de soja de coloração preta possuem maior tolerância ao ataque de microorganismos. Nesse sentido, os resultados obtidos nesse estudo sugerem que alterações na enzima lipoxigenase expressa em tegumentos de sementes de soja de coloração preta, podem ajudar a explicar as mudanças fenotípicas entre os genótipos com tegumento preto e tegumento amarelo. Entretanto, a confirmação desses resultados depende de um estudo mais detalhado de isolamento desses genes com posterior caracterização dessa proteína nesses genótipos.

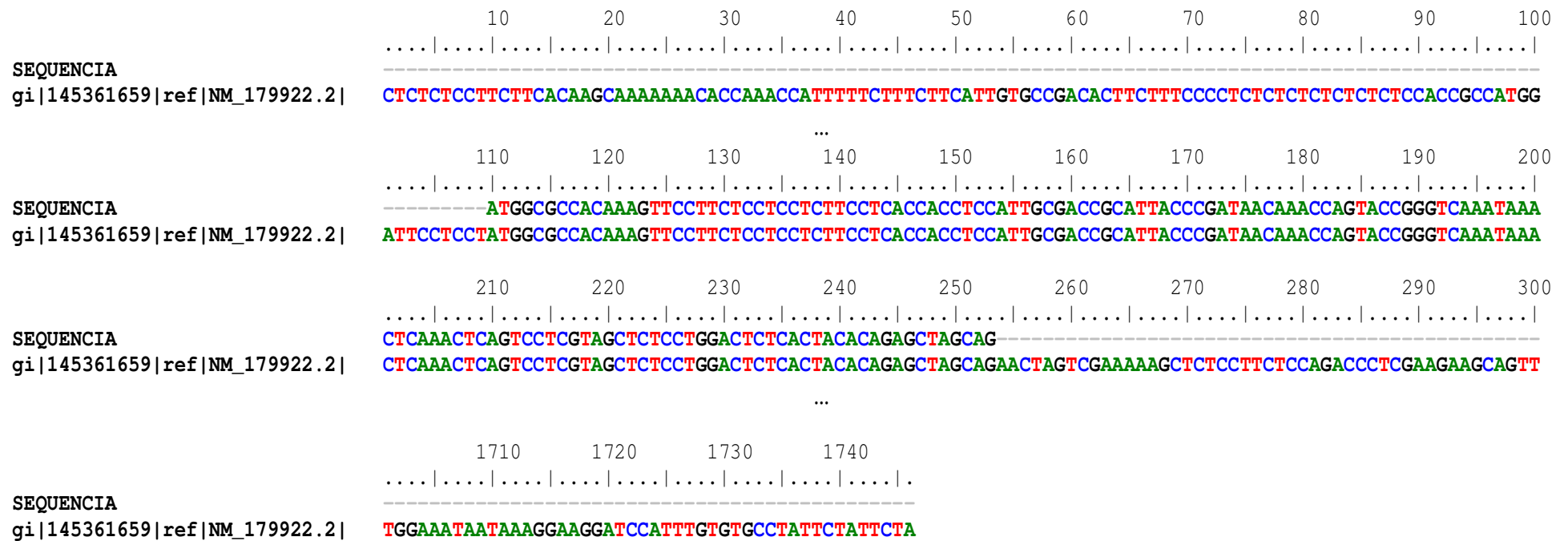


Figura 14. Alinhamento global entre sequência de cDNA obtida em tegumento de sementes de soja com coloração preta e a sequência da proteína arabinogalactana (*Fasciclin-like arabinogalactan protein (ABV27485.1) - Gossypium hirsutum*).





Figura 15. Alinhamento global entre sequência de cDNA obtida em tegumento de sementes de soja com coloração preta e a sequência da proteína com domínio TCP (TCP - *domain-like protein I* (ABD72481.1) - *Gossypium hirsutum*).



```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
sequencia
gi|196166897:26-550 Ziziphus j  -----AGTAATGGAGTTATTCGCTGATGTTACTCCAAAAACCGCTG

          110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
sequencia
gi|196166897:26-550 Ziziphus j  AGAATTTCCGCGTCCTTTGCACTGGGGAGAAAGGGATTGGAATTTCTGGGAAGCCACTGCACATAAAGGGC-----
AGAATTTCCGCGTCCTTTGCACTGGGGAGAAAGGGATTGGAATTTCTGGGAAGCCACTGCACATAAAGGGCTCCACCTTCCACCGTATTATTCCAAACTT

          210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
sequencia
gi|196166897:26-550 Ziziphus j  TATGTGTCAGGGTGGAGATTTCAACAGGGGTAATGGGACTGGAGGAGAAATCCATCTATGGTACAAAGTTTGCAGATGAGAACTTCAAGCTGAAACACACA

          310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
sequencia
gi|196166897:26-550 Ziziphus j  GGCCCTGGAATTTTGTCAATGGCAAATGCTGGACCAAACACTAATGGTTCCAGTTCCTTTATATGTACAGAGAAGACCCCGTGGCTTGATGGAAGCATG

          410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
sequencia
gi|196166897:26-550 Ziziphus j  TTGTGTTTGGTAAAGTTGTTGATGGGTATAATGTCGTCAAAGAGATGGAGAAGGTGGTTCAGATAGTGGGAGAAC TTCACAACCTGTTGTCATTGAAGA

          510     520
.....|.....|.....|.....|.....|
sequencia
gi|196166897:26-550 Ziziphus j  TTGTGGTCAGATAACAGGGAAGTGA

```

Figura 17. Alinhamento global entre sequência de cDNA obtida em tegumento de sementes de soja com coloração preta e a sequência da proteína ciclofilina, (*Cyclophilin* (ACG70968.1) - *Ziziphus jujuba*).

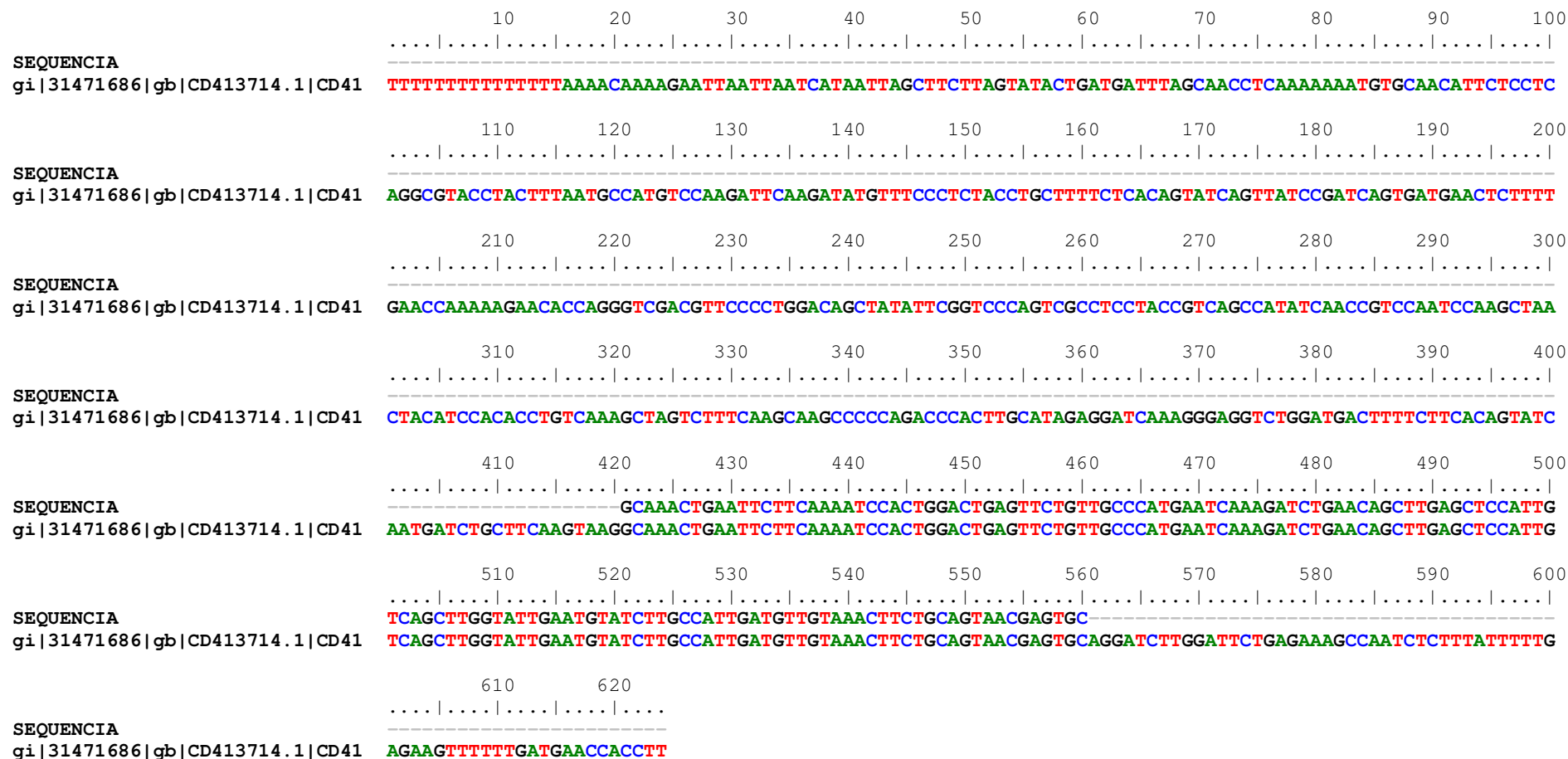


Figura 18. Alinhamento global entre sequência de cDNA obtida em tegumento de sementes de soja com coloração preta e a sequência de proteína induzida por ácido salicílico, (*Salicylic acid induced protein* (CD391498.1) - *Glycine max*).

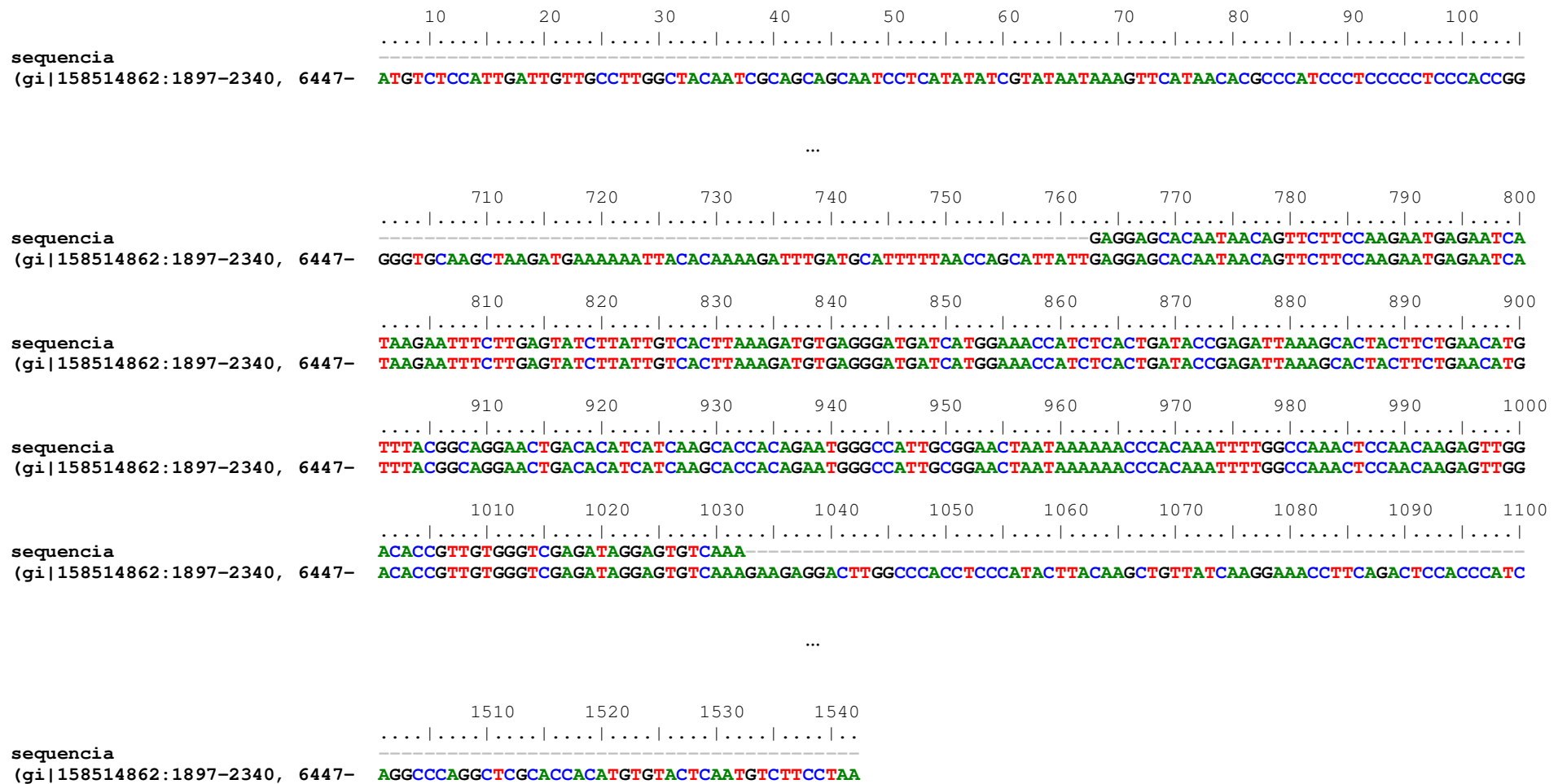


Figura 19. Alinhamento global entre sequência de cDNA obtida em tegumento de sementes de soja com coloração preta e a sequência da proteína flavonóide 3`hidroxilase (*Flavonoid 3'-hydroxylase* (ABW69385) - *Glycine max*) cultivar Williams.

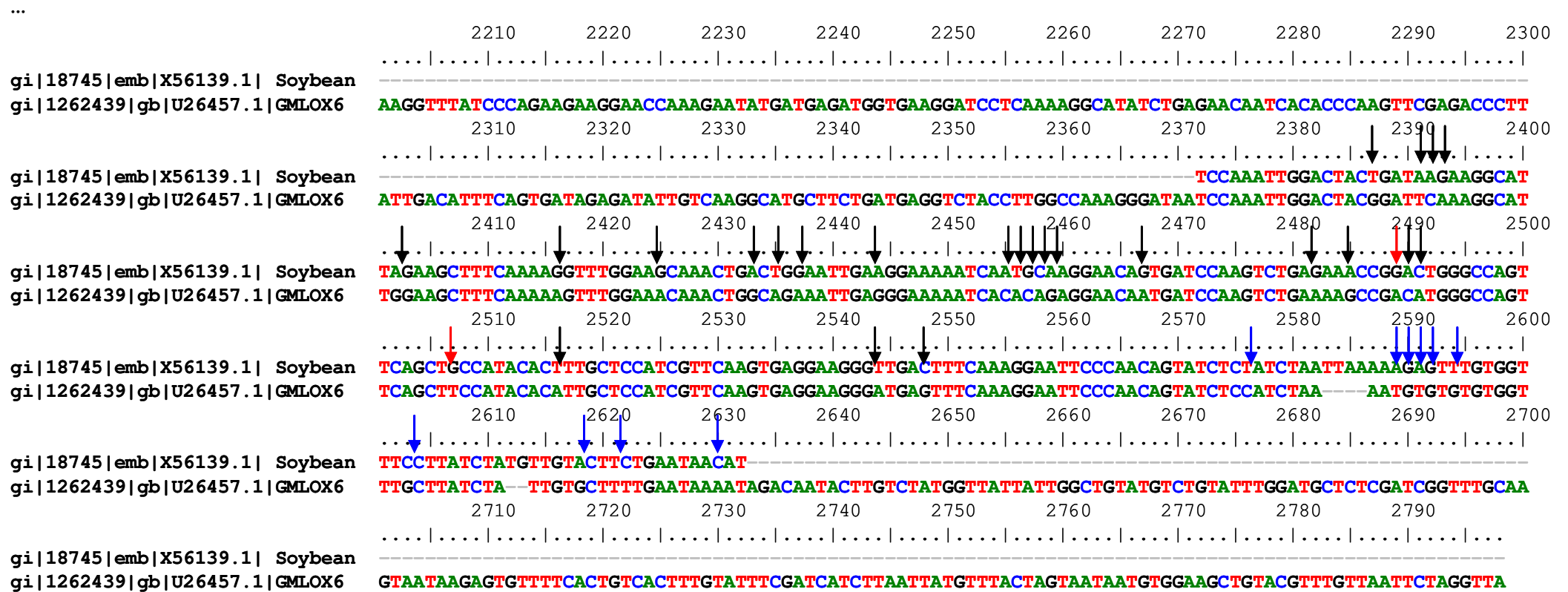


Figura 20. Alinhamento global entre sequência de nucleotídeos da proteína lipoxigenase (*Lipoxygenase* (U26457.1) - *Glycine max*) e a sequência de cDNA obtida em tegumentos de sementes de soja de coloração preta. Setas pretas indicam alterações nucleotídicas que resultam na substituição do aminoácido, setas vermelhas indicam mutações silenciosas e setas azuis mutações que ocorreram após o códon terminação.

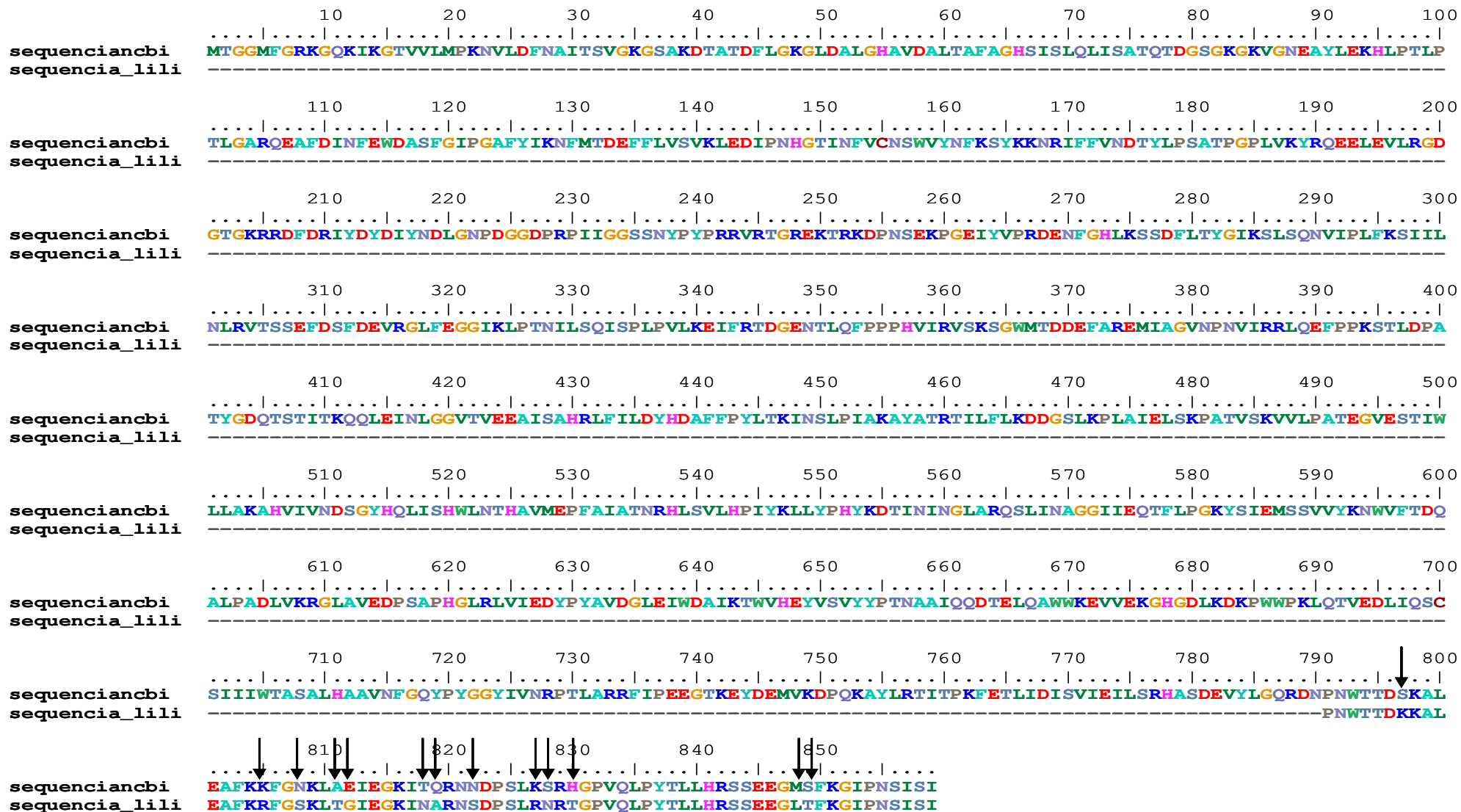


Figura 21. Alinhamento global entre seqüência de aminoácidos da proteína lipoxigenase (*Lipoxygenase* (U26457.1) - *Glycine max*) e a tradução da seqüência de cDNA obtida em tegumentos de sementes de soja de coloração preta. Setas indicam locais onde houve a troca de aminoácidos.

## 5. CONCLUSÕES

1 – Os genes correspondentes as proteínas flavonóide 3'-hidroxilase, proteína arabinogalactana, lipoxigenase, ciclofilina, proteína induzida por ácido salicílico, proteína com domínio dedo de zinco e proteína com domínio TCP, apresentaram-se diferencialmente expressos entre tegumentos de sementes de soja com caracteres contrastantes, linhagem TP (tegumento de coloração preta) e cultivar CD-202 (tegumento de coloração amarela).

2 – Algumas dessas proteínas possuem relação com a qualidade de sementes e podem auxiliar a explicar as diferenças fenotípicas existentes entre os tegumentos desses genótipos.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRASEM. Associação Brasileira de Sementes e Mudanças. Estatística da produção. **Anuário Abrasem**, 2009, Pelotas, p.32, 2009.

ADAMS, M.D.; KERLAVAGE, A.R.; FLEISCHMANN, R.D. et al. Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. **Nature**, v. 377 (suppl): p.3-174, 1995.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W. et al. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v.98, p.12473-12478, 1990.

ALVAREZ, P.J.C.; KRZYZANOWSKI, F.C.; MANDARINO, J.M.G.; FRANÇA-NETO, J.B. Relationship between soybean seed coat lignin content and resistance to mechanical damage. **Seed Science and Technology**, v.25, n.2, p.209-214. 1997.

ASIEDU, E.A.; POWELL, A.A. Comparisons of storage potential of cultivar of cowpea (*Vigna unguiculata*) differing in seed coat pigmentation. **Seed Science and Technology**, v. 26, n.1, p. 211-221, 1998.

BACHEM, C.W.; VAN DER HOEVEN, R.S.; de BRUJIN, S.M.; VREUGDENHIL, D.; ZABAEU M, VISSER R.G. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. **The Plant Journal**, v.9, n.5, p.745-753, 1996.

BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W. JONES, R.L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000, 1367p.

CARBONELL, S.A.M; KRZYZANOWSKI, F.C. The pendulum test for screening soybean genotypes for seeds resistant to mechanical damage. **Seed Science and Technology**, v.23, n.2, p.331-339, 1995.

CAPELETI, I.; FERRARESE, M.L.L.; KRZYZANOWSKI, F.C.; FERRARESE FILI O. A new procedure for quantification of lignin in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seed coat and their relationship with resistance to mechanical damage. **Seed Science and Technology**, v.33, n.2, p.511-515, 2005.

CARRARO, I.M.; PESKE, S.T. Uso de sementes de soja no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.27, n.2, p.75-80, 2005.

CHACHALIS, D.; SMITH, M.L. Imbibition behavior of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) accessions with different testa characteristics. **Seed Science and Technology**, v.28, n.2, p.321-331, 2000.

CONAB. Safras: comparativo da área, produção e produtividade. Acessado em dezembro 2009. On-line. Disponível na Internet: <http://www.conab.gov.br>.

COSTA, N.P.; MESQUITA, C.M.; MAURINA, A.C.; FRANÇA-NETO, J.B.; PEREIRA, J.E.; BOURDINGNON, J.R.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A. Efeito da colheita mecânica da soja nas características físicas, fisiológicas e químicas das sementes em três estados brasileiros. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.1, p.140-145, 2001.

CUBAS, P.; LAUTER, N.; DOEBLEY, J.; COEN, E. The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. **Plant Journal**, v.18, n.2, p.215-22, 1999.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y.C.; CAMPBELL, A.P. et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generation differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n.12, p.6025-6030, 1996.

DOEBLEY, J.; STEC, A.; GUSTUS, C. Teosinte branched1 and the origin of maize: evidence for epistasis and the evolution of dominance. **Genetics** 141, n.1, p.333-346. 1995.

DOEHLERT, D.C.; WICKLOW, D.T.; GARDNER, H.W. Evidence implicating the lipoxygenase pathway in providing resistance to soybean against *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, v.83, n.12, p.1473–1477, 1993.

FRANÇA NETO, J.B.; POTTS, H.C. Efeitos da colheita mecânica e da secagem artificial sobre a qualidade da semente dura em soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.1, n.2, p.64-77, 1979.

FRIEDMANN, M.; RALPH S.G.; AESCHLIMAN, D.; ZHUANG, J.; RITLAND, K.; ELLIS B.E.; BOHLMANN, J.; DOUGLAS, C.J. Microarray gene expression profiling of developmental transitions in Sitka spruce (*Picea sitchensis*) apical shoots. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.3, p.593-614, 2007.

GIJZEN, M.; MILLER, S.; KUFLU, K.; BUZZELL, R.I.; MIKI, B.L.A. Hydrophobic protein synthesized in the pod endocarp adheres to the seed surface. **Plant Physiology**, v.120, p.951–959, 1999.

GIJZEN, M.; WENG, C.; KUFLU, K.; WOODROW, L.; YUK, POYSA V. Soybean seed lustre phenotypes and surface protein cosegregate and map to linkage E. **Genome**, v.46, p.659–664, 2003.

GODOY, A.V.; LAZZARO, A.S.; CASALONGUE, C.A.; SAN SEGUNDO, B. Expression of a *Solanum tuberosum* cyclophilin gene is regulated by fungal infection and abiotic stress conditions. **Plant Science**, v.152, n.2, p.123–134, 2000.

HABU, Y.; FUKUDA-TANAKA, S.; HISATOMI, Y.; LIDA, S. Amplified restriction fragment length polymorphism based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-pb sequence. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** n.234, p.516-521, 1997.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p.95, 1999.

HE, Y.; GAN, S. A novel zinc-finger protein with a proline-rich domain mediates ABA-regulated seed dormancy in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, v.54, p.1-9, 2004.

HEATHERLY, L.G.; KENTY, M.M.; KILEN, T.C. Effects of storage environment and duration on impermeable seed coat in soybean. **Field Crops Research**, v.40, n.1, p.57-62, 1995.

ITO, S.; SUZUKI, Y.; MIYAMOTO, K.; UEDA, J.; YAMAGUCHI, I. AtFLA11, a Fasciclin-Like Arabinogalactan-Protein specifically localized in sclerenchyma cells. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.69, n.10, p.1963–1969, 2005.

KAADIGE, M.R.; AYER, D.E. The polybasic region that follows the plant homeodomain zinc finger 1 of PF1 is necessary and sufficient for specific phosphoinositide binding. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.39, p.28831-28836, 2006.

KEBROM, T.H.; BURSON, B.L.; FINLAYSON, S.A. Phytochrome B represses teosinte branched1 expression and induces Sorghum axillary bud outgrowth in response to light signals. **Plant Physiology**, v.140, n.3, p.1109-1117, 2006.

KONG, H.Y.; LEE, S.C.; HWANG, B.K. Expression of pepper cyclophilin gene is differentially regulated during the pathogen infection and abiotic stress conditions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.59, n.4, p.189–199, 2001.

KULIK, M.M.; YAKLICH, R.W. Soybean seed coat structures: relationship to weathering resistance and infection by the fungus *Phomopsis phaseoli*. **Crop Science**, v.31, n.1, p.108-113, 1991.

KUO, W.H.J. Delayed permeability of soybean seeds: characteristics and screening methodology. **Seed Science and Technology**, v.17, p.131-142, 1989.

LEGESSE, N.; POWELL, A.A. Relationship between the development of seed coat pigmentation, seed coat adherence to the cotyledons and the rate of imbibition during the maturation of grain legumes. **Seed Science and Technology**, v.24, n.1, p.23-32, 1996.

LEPINIEC, L.; DEBEAUJON, I.; ROUTABOUL, J.M.; BAUDRY A.; POURCEL, L.; NESI, N.; CABOCHE, M. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. **Annual Review of Plant Biology**, v.57, n.1, p.405-430, 2006

LI, C.; POTUSCHAK, T.; COLON-CARMONA, A.; GUTIERREZ, R.A.; DOERNER, P. *Arabidopsis* TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102, n.36, p.12978–12983, 2005.

LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v. 257, n.5072, p.967-971, 1992.

LISITSYN, N.; LISITSYN, N.; WIGLER, M. Cloning the differences between two complex genomes. **Science**, v. 259, n.5097, p.946-951, 1993.

LUO, D.; CARPENTER, R.; VINCENT, C.; COPSEY, L.; COEN, E. Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*. **Nature**, v.383, n.6603, p.794–799, 1996.

MA, E.; CHOLEWA, E.; MOHAMED, T.; PETERSON, C.A.; GIJZEN, M. Cracks in the Palisade Cuticle of Soybean Seed Coats Correlate with their Permeability to Water. **Annals of Botany Company**, v.94, n.2, p.213-228, 2004.

MALONE, G.; PESKE, S.T.; ZIMMER, P.D.; MALONE, E.; MENEGHELLO, G.E.; DE OLIVEIRA, COSTA A. Single nucleotide polymorphism (SNP) detection in the red rice  $\alpha$ -amylase gene *amy1*: effect on seedling vigour. **Seed Science and Technology**, v.36, n.2, p.447-445, 2008.

MAO, C.; YI, K.; YANG, L.; ZHENG, B.; WU, Y.; LIU, F.; WU, P. Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.394, p.137-143, 2004.

MERTZ, L. M. Caracterização morfo-fisiológica e identificação de fragmentos de cDNA diferencialmente expressos em tegumentos de sementes de soja com permeabilidade contrastante. Pelotas, 2007, 60p., **Dissertação** (Mestrado), Universidade Federal de Pelotas.

MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; CRUZ<sup>1</sup>, H.L.; MENEGHELLO, G.E.; FERRARI, C.S.; ZIMMER, P.D. Diferenças estruturais entre tegumentos de sementes de soja com permeabilidade contrastante. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.23-29, 2009.

MESQUITA, C.M.; COSTA, N.P.; PEREIRA, J.E.; MAURINA, A.C.; ANDRADE, J.G.M. Colheita mecânica da soja: avaliação das perdas e da qualidade física da qualidade física do grão. **Engenharia Agrícola**, v.18, n.3, p.44-53, 1999.

MILLER, S.S.; BOWMAN, L.A.; GIJZEN, M.; MIKI, B.L.A. Early development of the seed coat of soybean. **Annals of Botany**, n.84, n.3, p.297-304, 1999.

MOÏSE, J.A.; HAN S.; GUDYNAITE-SAVITCH, L.; JOHNSON, D.A.; MIKI, B.L.A. Seed Coats: Structure, Development, Composition, and Biotechnology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.41, n.5, 620–644, 2005.

NEWELL, C.A.; HYMOWITZ, T. Seed coat variation in *Glycine* Willd. subgenus *Glycine* (Leguminosae) by SEM. *Brittonia* v.30, p.76–88, 1978.

PESKE, S. T.; PEREIRA, L. A.G. Tegumento da semente de soja. **Tecnologia de sementes**, v. 6, p. 23-34, n.1/2, 1983.

RAGUS, L.N. Role of water absorbing capacity in soybean germination and seedling vigour. **Seed Science and Technology**, v.15, n.1, p. 285-296, 1987.

ROESSING, A.C.; TOLEDO, J. F. F.; GALERANI, P. B. Histórico e desenvolvimento. In: **A cultura da soja no Brasil**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 2000 – CD - Rom.

ROMANO, P.G.N.; HORTON, P.; GRAY, J.E. The *Arabidopsis* cyclophilin gene family. **Plant Physiology**, v.134, n.4, p.1268–1282, 2004.

SANTOS, E.L.; POLA, J.N.; BARROS, A.S.R.; PRETE, C.E.C. Qualidade fisiológica e composição química das sementes de soja com variação na cor do tegumento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n.1, p. 20-26, 2007.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W.; BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v.270, n.5235, p. 467-470, 1995.

SHUSTER I. O DNA da semente, 2003. Acessado em fevereiro de 2010. On-line. Disponível na Internet: <http://www.coodetec.com.br/artigos>.

SOUZA, F. H. D.; MARCOS-FILHO, J. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n.4, p. 365-375, 2001.

STICHER, L.B.; MANI, M.; METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.235-270, 1997.

SWANSON, B.G.; HUGHES, J.S.; RASMUSSEN, H. Seed microstructure: review of water imbibition in legumes. **Food Microstructure**, v.4, n.1, p. 115-153, 1985.

TAKAHASHI, R. Association of soybean genes *I* and *T* with low temperature-induced seed coat deterioration. **Crop Science**, v.37, n.6, p.1755–1759, 1997.

TAKAHASHI, R.; ASANUMA, S. Association of *T* gene with chilling tolerance in soybean. **Crop Science**, v.36, n.3, p.559–562, 1996.

TAVARES, D.Q.; MIRANDA, M.A.C.; UMINO, C.Y.; DIAS, G.M. Características estruturais do tegumento de sementes permeáveis e impermeáveis de linhagens de soja. **Revista Brasileira de Botânica**, v.10, n.2, p. 147-153, 1987.

TODA, K.; YANG, D.; YAMANAKA N.; WATANABE, S.; HARADA, K.; TAKAHASHI R. A single-base deletion in soybean flavonoid 3'-hydroxylase gene is associated with gray pubescence color. **Plant Molecular Biology**, v.50, n.2, p.187–196, 2002.

TODD, J. J.; VODKIN, L. O. Duplications that suppress and deletions that restore expression from a chalcone synthase multigene family. **Plant Cell**, v.8, n.4, p.687–699, 1996.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.11, n.22, 4673-80, 1994.

USDA: United States Department of Agriculture - Acessado em dezembro 2009. Online. Disponível na Internet: <http://www.usda.gov/>.

YANG, X.; TU, L.; ZHU, L.; FU, L.; MIN, L.; ZHANG, X. Expression profile analysis of genes involved in cell wall regeneration during protoplast culture in cotton by suppression subtractive hybridization and macroarray. **Journal of Experimental Botany**, v.59, n.13, p.3661-3674, 2008.

VAUGHAN, D.A.; BERNARD, R.L.; SINCLAIR, J.B.; KUNWAR, I.K.; Soybean seed coat development. **Crop Science**, v.27, n.4, p.759–765, 1987.

VELCULESCU, F.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Serial analysis of gene expression. **Science**, v. 270, n.5235, p.484-487, 1995

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p.4407-4414, 1995.

WILSON, R.A.; GARDNER, H.W.; KELLER, N.P. Cultivar-dependent expression of a maize lipoxygenase responsive to seed infesting fungi. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, v.14, n.8, p.980–987, 2001.

WERKER, E.; MARBACH, I.; MEYER, A.M. Relationship between the anatomy of the testa, water permeability and presence of phenolics in the genus *Pisum*. **Annals of Botany**, v.43, n.6, 765-771, 1979.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. **Plant Physiology**, v.11, n.5, p.327-334, 1997.

ZABALA, G.Z.; VODKIN L.O. Cloning of the pleiotropic T locus in soybean and two recessive alleles that differentially affect structure and expression of the encoded flavonoid 3' hydroxylase. **Genetics**, v.163, n.1, p.295-309, 2003.

ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application, publication 0 534 858 A1, bulletin 93/13, 1993.

ZERINGUE, H.; BROWN, R.; NEUCERE, J.; CLEVELAND, T. Relationship between C6-C12 alkanal and alkenal volatile contents and resistance of maize genotypes to *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, n.2, p.403–407, 1996.



## ANEXOS

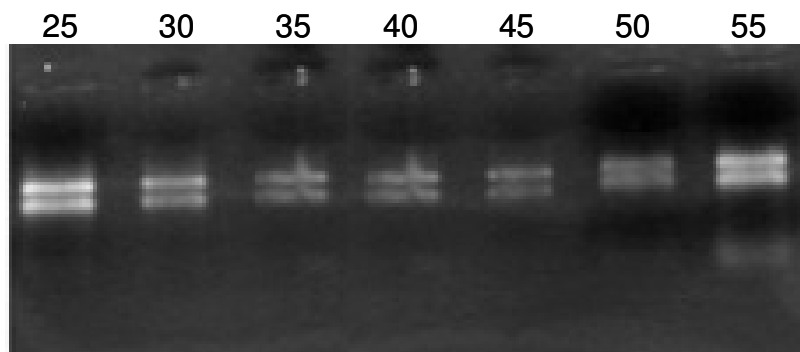


Figura 22. RNA total em gel de agarose 1%, extraído de tegumentos de soja da linhagem TP aos 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 dias após a antese, utilizando o reagente *Pure Link Plant RNA* (Invitrogen).

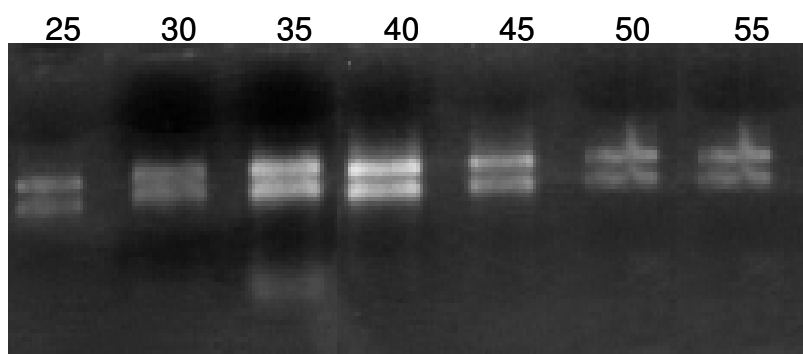


Figura 23. RNA total em gel de agarose 1%, extraído de tegumentos de soja da cultivar CD-202 aos 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 dias após a antese, *Pure Link Plant RNA* (Invitrogen).

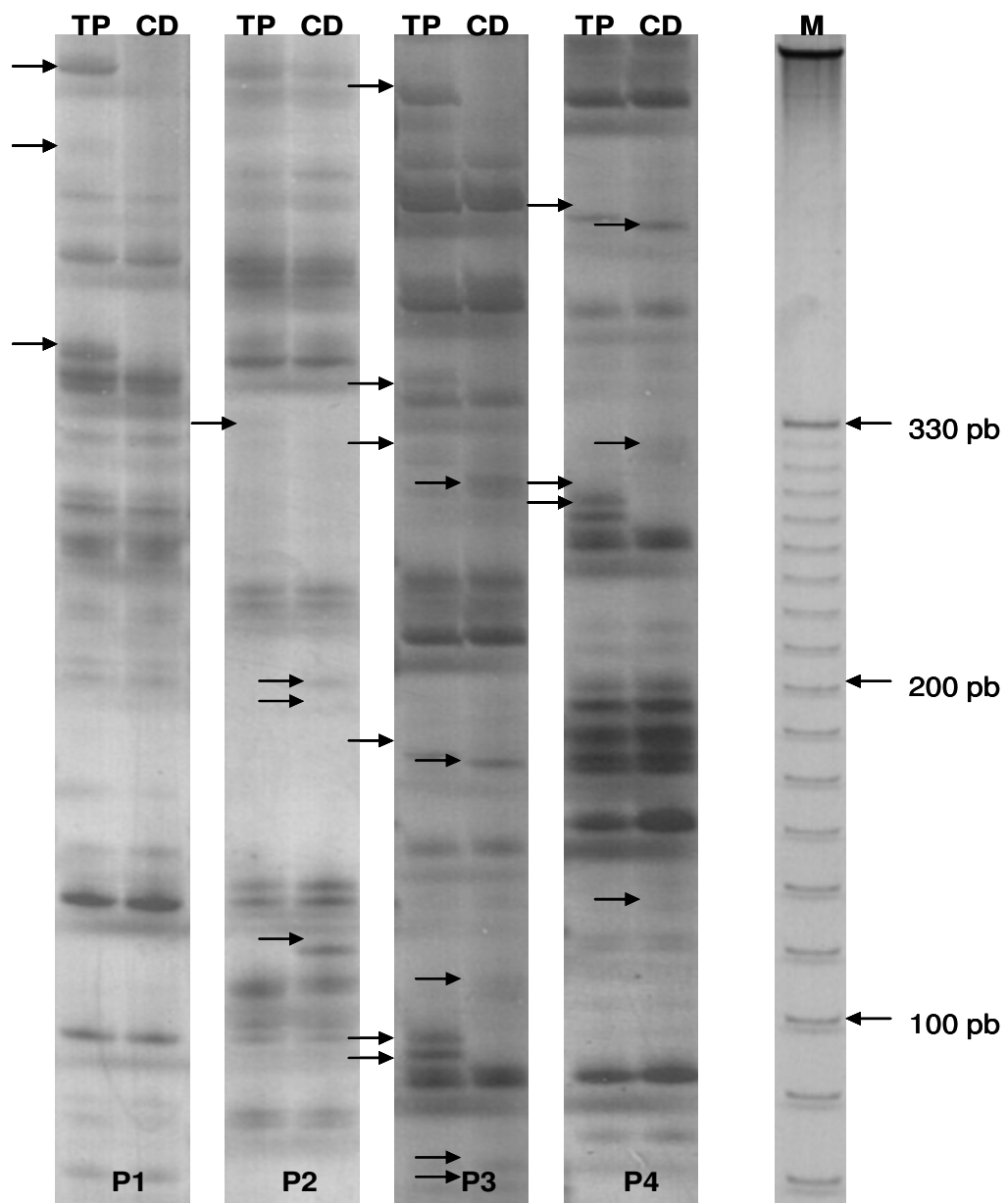


Figura 24. cDNA-AFLP em gel de poliacrilamida 5%, de tegumentos de sementes de soja de dois genótipos, TP (Tegumento Preto) e CD 202 (Tegumento amarelo), com diferentes combinações de iniciadores. P1-*EcoRI*-ACC/*MseI*-CTC, P2-*EcoRI*-ACT/*MseI*-CAT, P3-*EcoRI*-ACG/*MseI*-CTT, P4-*EcoRI*-AGC/*MseI*-CAC, M-Marcador de peso molecular 30-330pb. Setas indicam genes diferencialmente expressos entre os dois genótipos.

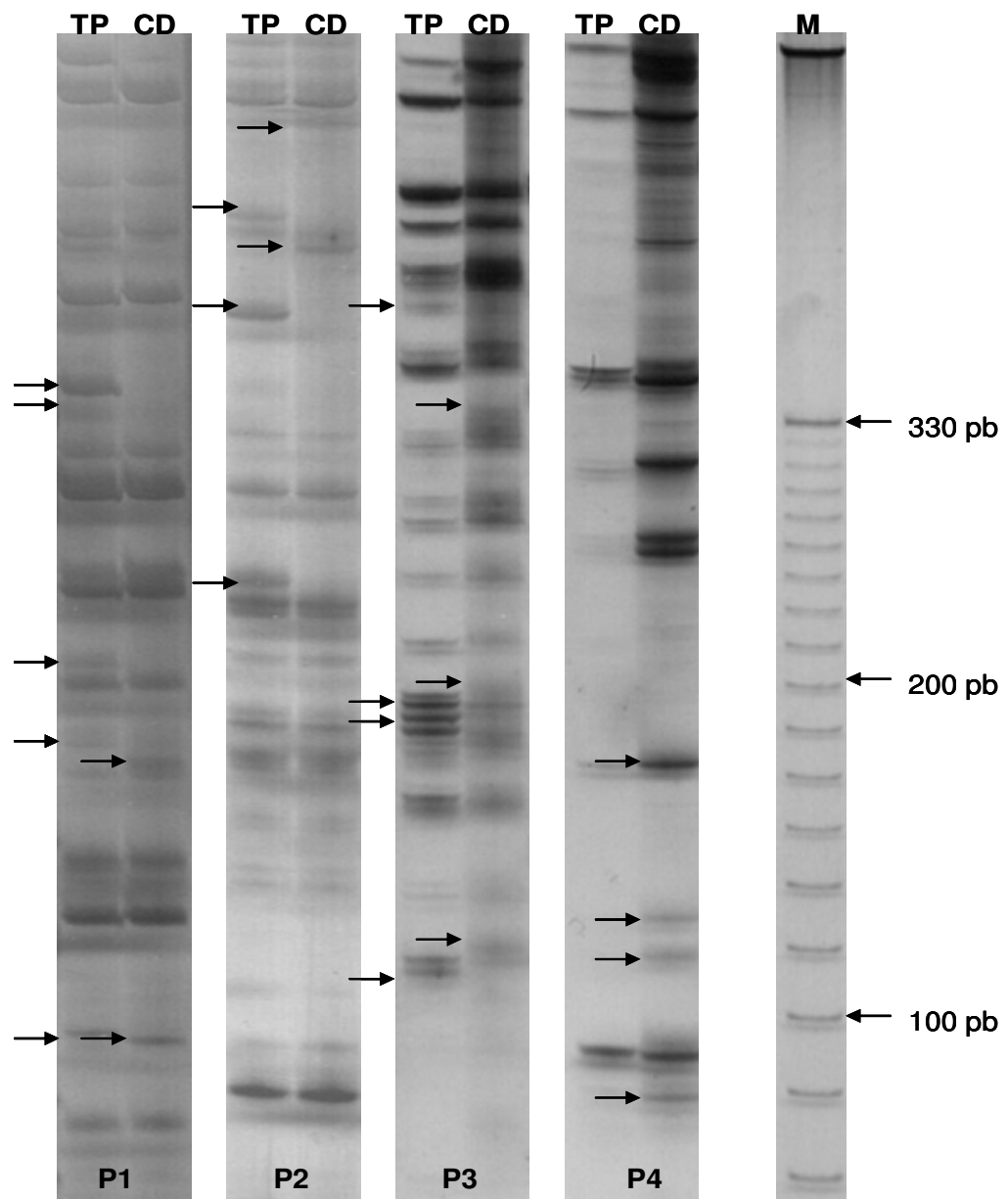


Figura 25. cDNA-AFLP em gel de poliacrilamida 5%, de tegumentos de sementes de soja de dois genótipos, TP (Tegumento Preto) e CD 202 (Tegumento amarelo), com diferentes combinações de iniciadores. P5-*EcoRI*-AGC/*MseI*-CTC, P6-*EcoRI*-AGG/*MseI*-CTG, P7-*EcoRI*-AAG/*MseI*-CTC, P8-*EcoRI*-AGG/*MseI*-CTC, M-Marcador de peso molecular 30-330pb. Setas indicam genes diferencialmente expressos entre os dois genótipos.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)