

## EXPRESSÃO DO GENE VLXC DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO TEGUMENTO DE SEMENTES DE SOJA

RONAN RITTER<sup>1</sup>; CAROLINA TERRA BORGES<sup>2</sup>; MARIANA PEIL DA ROSA<sup>3</sup>  
 PAULO DEJALMA ZIMMER<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – ronanritter@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – carol\_tborges@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – marianapeil@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – dejalma@msn.com

### 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é grande produtor de soja colhendo na safra 2012/13 mais de 81.4 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2013). Devido a esta expressividade na produção nacional, a pesquisa busca materiais com potencial que possam suprir a demanda, com caracteres de interesse agrônomo. A semente é o veículo de transmissão dessas informações inerentes à cultura e de ganhos genéticos resultantes de um eficiente programa de melhoramento (SANTOS et al., 2007).

Durante o processo de produção da semente diversos fatores, como intempéries ambientais e a ocorrência de danos mecânicos nos processos de colheita, beneficiamento e armazenamento, podem comprometer a qualidade da semente. A suscetibilidade das sementes a tais fatores pode estar relacionada às características do tegumento das mesmas (SOUZA E MARCOS FILHO, 2001). Essa estrutura que envolve a semente atua como modulador das interações entre a parte interna desta e o meio externo, controlando trocas de umidade e gases com o ambiente, regula a germinação e ainda interfere nos mecanismos de dormência (MARCOS FILHO, 2005).

Relacionada às características fisiológicas e físicas da semente, a cor do tegumento pode indicar determinados comportamentos quando essa é exposta aos fatores externos. Segundo Santos (2007) a expressão da cor escura no tegumento das sementes afeta positivamente a qualidade fisiológica, devido a menor velocidade de embebição ocasionada pela maior concentração de lignina nesse tegumento.

Soja com tegumento preto possui semipermeabilidade marcante em suas linhagens. Esta característica atribui um diferencial positivo para resistência aos danos mecânicos durante a colheita, menor índice de ocorrência de danos causados por percevejos, e maior tolerância à deterioração a campo quando comparada a soja de tegumento amarelo (FRANÇA NETO et al., 2000).

Mertz et al., (2010) em estudo com tegumento de sementes de soja, sequenciaram fragmentos de cDNA, dentre os quais, identificaram fragmento correspondente ao gene da proteína lipoxigenase (VLXC) que estaria envolvida na defesa de patógenos e estresses abióticos (HU et al., 2009). Os resultados do aumento da expressão de lipoxigenases induz a atividade dos inibidores de proteases, indicando um possível mecanismo de resposta da planta de soja ao ataque de patógenos (SILVA, F. B, 2004). Outro trabalho, também demonstrou que a proteína VLXC, tem como papel o armazenamento temporário de nitrogênio em soja (FISCHER et al., 1999).

Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão gênica da proteína VLXC durante o desenvolvimento do tegumento de soja contrastante, em épocas distintas de coleta após a antese.

## 2. METODOLOGIA

Para a obtenção do material vegetal, o experimento foi instalado em casa de vegetação da Estação Terras Baixas da Embrapa Clima Temperado em Pelotas-RS, em delineamento casualizado, com cinco repetições. Foram utilizados dois genótipos de soja contrastantes para as características de tegumento, BMX Potência RR (tegumento amarelo) e IAC (tegumento preto).

A partir da antese iniciou-se a marcação de flores para que todas as sementes amostradas estivessem no mesmo estágio de desenvolvimento. Desse modo, foram realizadas três amostragens condizentes aos 25, 40 e 55 dias após a antese. Logo após a coleta, as sementes foram colocadas em nitrogênio líquido e levadas até o Laboratório de (FAEM/UFPel), onde os tegumentos foram separados e permanecendo os mesmos estocados à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração de RNA.

O RNA foi extraído dos tegumentos de cada um dos genótipos, para cada época de coleta, através do reagente PureLink™ (*Plant RNA Reagent – Invitrogen™*), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram submetidas à digestão com DNase I™ (*Invitrogen™*) e tiveram sua pureza e integridade mensuradas através de análises de absorvância (260/280 nm), através do espectrofotômetro Nano Vue (Plus Spectrophotometer) e eletroforese em gel de agarose 1%. A obtenção do cDNA fita simples foi sintetizada por transcrição reversa, a partir da concentração de RNA total utilizando a enzima SuperScript™ III First-Strand Synthesis System para RT-PCR (*Invitrogen™*) segundo as recomendações do fabricante.

Os pares de *primers* VLXC correspondentes ao gene estudado, juntamente com os endógenos ACT11 e SKIP 16 foram obtidos a partir das sequências depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A análise quantitativa de expressão gênica em tempo real (RT-PCR) dos genes foi realizada em um equipamento LightCycler 480 Instrument II (96)™ (*Roche Applied Science™*) usando o SYBR® Green.

No final dos ensaios de reação foi obtido o CT (Threshold Cycle) do aumento da fluorescência ocorrido durante os ciclos da reação. Os dados ópticos foram, posteriormente, analisados com auxílio do programa LightCycler® 480 Gene Scanning Software. O cálculo  $\Delta\Delta\text{CT}$  (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008) baseado na reação exponencial da PCR, foi obtido a partir da expressão  $\text{QR} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ , no qual QR representa o nível de expressão gênica, CT o ciclo de amplificação na qual cada amostra apresenta amplificação exponencial,  $\Delta\text{CT}$  se refere à diferença entre o CT da amostra amplificada para o gene alvo e o CT da mesma amostra amplificada para o gene controle (ACT11 e SKIP 16) e o  $\Delta\Delta\text{CT}$  representa a diferença entre o  $\Delta\text{CT}$  da amostra de interesse e o  $\Delta\text{CT}$  da amostra de referência-calibrador, que foi adotado a época 25 dias de coleta para cada genótipo.

Os dados de Quantificação Relativa foram submetidos à análise de homogeneidade da variância e normalidade dos erros (Shapiro Wilk), e posteriormente a ANOVA. Constatada a significância, procedeu-se o teste de médias por Duncan a 5% probabilidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação entre os fatores de tratamento estudados. Os níveis da expressão transcricional do gene VLXC, quantificados nos tegumentos dos dois genótipos de soja, em diferentes épocas de maturação, estão apresentados na FIGURA 1.

Foi observado que a quantificação relativa do gene VLXC, para a cultivar BMX Potência, se manteve constante nas épocas avaliadas, não diferindo estatisticamente.

O genótipo IAC apresentou uma variação na quantificação relativa, visto que aos 55 dias ele obteve a maior expressão desse gene. Em contrapartida, aos 40 dias, esse genótipo, apresentou a menor quantificação relativa.

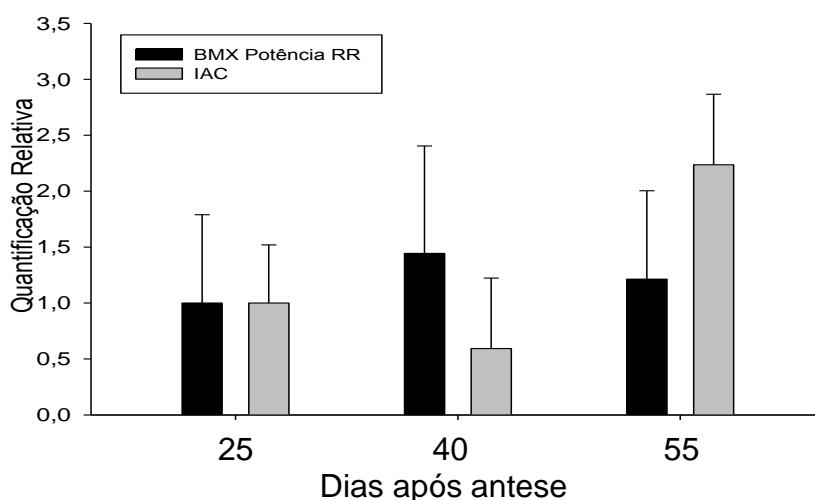


FIGURA 1 – Expressão do gene VLXC em tegumento de semente de soja dos genótipos BMX Potência RR e IAC 222

As expressões nas diferentes amostragens corroboram com os resultados de SIEDOW (1991), que constatou que a atividade da enzima varia de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta.

Considerando que a proteína VLXC faz parte da família das lipoxigenases, pode-se inferir que a cultivar IAC apresenta maior resistência ao ataque de patógenos devido a maior expressão desse gene correspondente ao final do ciclo da cultura.

### 4. CONCLUSÃO

O acúmulo relativo de transcritos do gene VLXC em tegumento de semente de soja difere tanto entre as épocas avaliadas, bem como entre as cultivares estudadas.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_09\\_18\\_10\\_20\\_52\\_ia-set12.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_18_10_20_52_ia-set12.pdf) Acesso em 23 set. 2013.

FISCHER AM, DUBBS WE, BAKER R, FULLER MA, STEPHENSON LC, GRIMES HD Protein dynamics, activity, and cellular localization of soybean lipoxygenases indicate distinct functional roles for individual isoforms. **Plant Journal**. v.19, n.5, p.543–554, 1999

FRANÇA-NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; COSTA, N.P. Tecnologia de produção de sementes. In: EMBRAPA SOJA. A cultura da soja no Brasil. Londrina, 2000. 1 CD-ROM.

HILDEBRAND, D.F., HAMILTON-KEMP, T.R., LEGG, C.S., BOOKJANS, G. Plant lipoxygenases: occurrence, properties and possible functions. **Current Topics in Plant Biochem. and Physiol.**, v.7, p.201-219, 1988.

HU, T.; HU, Z.; QU, X.; REN, Y.; CHEN, G. Advances in plant lipoxygenases research. p.1-9. 2009.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p

MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; BORSUK, S.; DA MAIA, LC; DELLAGOSTIN, OA; PESKE, ST; ZIMMER, PD. cDNA-AFLP analyses between black and yellow soybean seed coats. **Seed Science and Technology**, v.38, n.1, p.88-95, 2010

SANTOS, E.L. dos. Qualidade fisiológica e composição química das sementes de soja com variação na cor do tegumento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, April 2007 vol. 29 no. 1

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v.3, n.6, p.1101-1108, 2008.

SIEDOW, J.N. Plant lipoxygenase: structure and function. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.42, p.145-188, 1991.

SILVA, F. B, 2004. Função bioquímica da via das lipoxigenases em plantas de soja submetidas ao ataque de mosca-branca (*bemisia argentifolii*). **Ciência Agrotecnica**, Lavras, Mar./Abr 2004 v. 28, n. 2, p. 406-413.

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.