

IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES EM SEQUÊNCIA DE LIPOXIGENASE EXPRESSA EM TEGUMENTOS DE SOJA DE COLORAÇÃO PRETA

VIANA, Taiane Peres¹; MERTZ, Liliane Marcia ¹; HENNING, Fernando Augusto¹; VENSKE, Eduardo¹; ZIMMER, Paulo Dejalma¹.

¹ Deptº de Fitotecnia – FAEM/UFPel Campus Universitário CEP 96010-900 taipv@hotmail.com.

1 INTRODUÇÃO

Diversos fatores afetam o processo de produção de sementes de soja, iniciando pelos fatores genéticos, passando pelas adversidades ocorridas no desenvolvimento das mesmas e após a maturidade fisiológica, expondo-as ao ataque de pragas e microrganismos e finalizando com a ocorrência de danos mecânicos nos processos de colheita, beneficiamento e armazenamento (MERTZ et al., 2009).

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.

Sementes de tegumento preto apresentam maior espessura da epiderme, menores taxas de embebição, maior resistência a deterioração de campo, maior conteúdo de lignina e maior tolerância ao ataque de microrganismos (PESKE e PEREIRA, 1983; TAVARES et al., 1987; KUO, 1989; CHACHALIS e SMITH 2000; MERTZ et al., 2009). Sem dúvida o contraste fenotípico do tegumento da semente de soja decorre da expressão diferencial de genes que podem ser de interesse à Ciência e Tecnologia de Sementes. Sendo que, as ferramentas da biotecnologia e da biologia molecular podem auxiliar na identificação de tais genes de interesse.

Dentre as proteínas que desempenham papel de importância na defesa contra microrganismos em plantas, destacam-se a família das lipoxigenases (LOX). Nesse sentido, 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).

O objetivo do estudo foi identificar mutações em sequências expressas do gene da lipoxigenase em tegumentos de sementes de soja de coloração preta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado o genótipo de soja TP (tegumento preto, semi-permeável e duro), contrastante para as características de tegumento da soja cultivada (tegumento amarelo, permeável e suscetível à deterioração).

O cultivo para obtenção dos materiais foi instalado em casa de vegetação. As plantas foram cultivadas em condições homogêneas no interior de baldes plásticos preenchidos com solo. Foram utilizadas quatro repetições de oito plantas, dispostas em duas plantas por balde, totalizando oito vasos. A partir da antese iniciou-se a marcação de flores para que todas as sementes amostradas estivessem no mesmo estágio fenológico.

A coleta das sementes foi realizada em sete amostragens com intervalos de coleta de 5 dias (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 dias após a antese). Depois de colhido, o material vegetal foi encaminhado ao Laboratório de Sementes e Biotecnologia do Departamento de Fitotecnia, FAEM/UFPel. O RNA total foi extraído utilizando-se o

reagente *Pure Link RNA* (Invitrogen) e o cDNA dupla-fita sintetizado a partir do kit *SuperScript Double Stranded cDNA Synthesis* (Invitrogen®). Pela técnica de cDNA-AFLP foi isolado o fragmento do gene da lipoxigenase expresso em tegumentos de sementes de soja do genótipo TP (tegumento preto). Posteriormente clonado em vetor *TOPO TA Clonig Kit* (Invitrogen) e seqüenciados em sequenciador automático *MegaBACE 500 DNA sequencer* (GE Healthcare) utilizando a tecnologia *Dynamic ET-terminator*. Ambas as extremidades da fita foram seqüenciadas utilizando-se três repetições de leitura.

Na análise *in silico* primeiramente realizou-se o tratamento das seqüências pelo programa *VecScreen* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>), afim de remover parte das seqüências pertencentes ao vetor. Em seguida, com auxílio do programa *ContigExpress® Vector NTI 10.0 suite* (Invitrogen), as repetições senso e anti-senso do seqüenciamento foram agrupadas em *contigs*.

Realizou-se um alinhamento global entre as seqüências depositadas nos bancos de dados e as seqüências de lipoxigenase provenientes do genótipo com tegumento preto 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).

Em seguida essas seqüências foram traduzidas em aminoácidos através da utilização do programa *ExpASy - Translate tool* (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 seqüência de aminoácidos das proteínas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A análise do alinhamento múltiplo entre a seqüência de lipoxigenase da soja com tegumento amarelo depositada em banco de dados e o fragmento obtido nesse trabalho, expressa em tegumento de sementes de coloração preta, mostrou um número expressivo de alterações nucleotídicas. Essa seqüência foi traduzida em aminoácidos e comparada com a 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. Dentro dessa região, houve alteração em 13 aminoácidos conforme indicado na Tabela 1.

Tabela 1. 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).

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 1). 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 na 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 do ácido glutâmico pela glicina - (Glu - Gly), ou seja, de um aminoácido ácido com carga negativa por um aminoácido neutro sem carga.

4 CONCLUSÕES

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.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPERGS, CNPq, CAPES e FINEP pelo apoio à realização da pesquisa.

6 REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; CRUZ, 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**, Londrina, v.31, n.1, p.23-29, 2009.

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

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**, São Paulo, v.10, n.2, p. 147-153, 1987.

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**, Oxford, v.11, n.22, 4673-80, 1994.

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**, Washington, v.44, n.2, p.403–407, 1996.