



**ALEXANA BALDONI**

**ANÁLISES FISIOLÓGICAS,  
ULTRAESTRUTURAIS E EXPRESSÃO GÊNICA  
DE LIGNINA EM SEMENTES DE SOJA**

**LAVRAS – MG**

**2010**

**ALEXANA BALDONI**

**ANÁLISES FISIOLÓGICAS, ULTRAESTRUTURAIS E EXPRESSÃO  
GÊNICA DE LIGNINA EM SEMENTES DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Sementes, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora  
Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

**LAVRAS – MG**

**2010**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Baldoni, Alexana.

Análises fisiológicas, ultraestruturais e expressão gênica de  
lignina em sementes de soja / Alexana Baldoni. – Lavras : UFLA,  
2010.

63 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Bibliografia.

1. Qualidade fisiológica. 2. PCR em tempo real. I. Universidade  
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.3421

**ALEXANA BALDONI**

**ANÁLISES FISIOLÓGICAS, ULTRAESTRUTURAIS E EXPRESSÃO  
GÊNICA DE LIGNINA EM SEMENTES DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Sementes, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 06 de agosto de 2010.

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa

EMBRAPA

Dr. João Almir de Oliveira

UFLA

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2010**

Aos meus pais, Cida e Antônio, por todo o amor, dedicação, incentivo, apoio e exemplos de honestidade e amor ao trabalho bem feito.

Vocês são as pessoas que mais acreditam no meu crescimento profissional e espiritual.

À minha irmã Ayssa, pelo companheirismo e amizade. E por sempre me fazer rir!

Aos meus queridos avós, Jacy (in memoriam), Ionice, Adelino e Jandira, pelo amor, orações e torcida para que eu sempre alcance meus objetivos.

Em especial, a Deus, por ser meu refúgio, minha fortaleza e pela oportunidade de estar matriculada nessa grande escola chamada Terra, aprendendo inúmeras lições, sobretudo o Amor universal.

## **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu anjo da guarda, por sempre estar comigo e também aos meus amigos de luz que me inspiraram na execução de cada etapa deste trabalho.

À professora Dra. Édila Vilela de Resende Von pinho pela orientação, paciência, confiança, ensinamentos experimentais, científicos e de escrita e pelos exemplos de dedicação e profissionalismo.

À Universidade Federal de Lavras e ao programa de pós-graduação em Fitotecnia do Departamento de Agricultura, pela oportunidade em realizar esse trabalho.

A toda minha família e amigos.

Aos meus amigos, Zein, Natashinha e Fofô, pela parceria e inúmeras horas de descontração.

À Joana e Viviane que muito me ajudaram na realização deste trabalho, sempre atenciosas e prestativas.

Aos funcionários do Setor de Grandes Culturas da UFLA, Alessandro, Manguinha, Júlio e Agnaldo, pela ajuda na execução dos trabalhos de campo.

Aos estagiários do LAS, principalmente aos alunos do bic-júnior que me ajudaram na etapa do experimento de campo.

Ao professor Dr. Élberis Pereira Botrel, por ter cedido parte de sua área para montagem do experimento de campo e por seus ensinamentos.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes, D. Elza, Laís, Elenir, Dalva, Wilder I e Wilder II por toda a ajuda, atenção e carinho.

Aos colegas do LCBM-UFLA, Solange, Luiz Gustavo e Brenda, pela paciência, conversas esclarecedoras sobre PCR em tempo real e empréstimo de materiais.

À Veridiana, Wesley e Guilherme do suporte científico da Applied Biosystems, pela atenção e pela ajuda ao iniciar os meus primeiros passos com o qPCR.

À Cris e Andréia, por me ajudarem com as estatísticas dos experimentos.

À Marli, secretária da pós-graduação do DAG, pela atenção e ajuda.

Às crianças da creche Emília de Andrade e aos pacientes do setor de hemodiálise da Santa Casa de Lavras, pelas valiosas lições de vida.

À Mariney, pela oportunidade de ter acompanhado seu trabalho de tese e aplicado os conhecimentos adquiridos no meu trabalho.

À Eloisa, do Laboratório de Microscopia Eletrônica, pela atenção e ajuda.

À Eveline, pela amizade e pelas correções de português.

À Carla e Simone, pelo companheirismo, risadas e apoio durante as aulas.

À minha grande amiga Cris Gris, pelos 11 anos de amizade, carinho, incentivo e apoio incondicional. Trabalhando com você, aprendi muito e isso com certeza facilitou meu trabalho.

Ao Gustavo, pela ajuda com o desenho dos primers.

Aos colegas do laboratório, pela convivência harmoniosa.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

Ao cidadão brasileiro, que paga seus impostos e possibilita o investimento em pesquisas.

A todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

“Se realmente estamos pensando em ser os melhores, não há nada de errado nisso. O problema é querer ser o maior. As pessoas que tentam ser as melhores, em todos os campos, vão para um lugar extremamente gratificante, que é o de ultrapassar barreiras, ver seu esforço verdadeiro ser retribuído. Ser melhor implica disciplina, esforço, trabalho. Muitas pessoas querem ser maiores. O que normalmente implica atalho, mágica, se dar bem, tirar do caminho aqueles que são melhores. Esse sonho de ser o maior é ilusório. Quem quer ser o maior vai descobrir a insignificância humana. Aqueles que continuam na busca da excelência verdadeira por meio do trabalho, do estudo – não para o engrandecimento de si mesmos, mas para cumprir sua função existencial, para dar vazão aos seus dons – terão um retorno maravilhoso. O que você conquistou em busca de sua melhor capacidade, isso é sagrado.”

Nilton Bonder



## RESUMO

Devido à elevada produção de grãos de soja inclusive de cultivares transgênicas, há demanda por grande volume de sementes de alta qualidade no mercado. Sabe-se que a qualidade fisiológica de sementes de soja pode estar relacionada ao teor de lignina presente principalmente no tegumento das sementes. Como na literatura são escassos os trabalhos relacionados à expressão gênica de lignina em sementes de soja, no presente trabalho objetivou-se estudar a expressão de genes envolvidos na via metabólica de lignina durante o desenvolvimento dessas sementes. Também foram analisados a ultraestrutura do tegumento das sementes assim como a qualidade fisiológica das sementes das cultivares BRS Celeste, BRS 133 e Savana consideradas de baixo teor de lignina e BRS Valiosa RR, BRS Silvânia RR e Doko consideradas de alto teor de lignina, produzidas na safra 2008/2009 na área experimental do Departamento de Agricultura da UFPA. Para a avaliação da qualidade das sementes foram realizados os testes de germinação, condutividade elétrica e envelhecimento acelerado. O teor de lignina foi determinado e utilizado em estudos de correlação fenotípica com os parâmetros usados para a análise da qualidade fisiológica. Para o estudo da expressão gênica as sementes foram colhidas durante os estádios de desenvolvimento R4, R5, R6 e R7. Os genes estudados foram PAL, CAD, C4H e C3H usando como controle endógeno o gene ELFB com duas repetições biológicas em triplicatas para cada tratamento. As análises ultraestruturais revelaram que o tegumento das sementes começa a se diferenciar no estágio R4, atingindo em R5 sua completa formação dividida em camada paliçádica, camada de células em ampulheta e parênquima lacunoso. Ocorre maior expressão dos genes C4H e PAL somente nos estádios R5 e R6 de desenvolvimento. O gene CAD se expressa nas fases finais de desenvolvimento das sementes de soja e em cultivares com baixo teor de lignina há maior expressão do gene PAL nos estádios R6 e R7 de desenvolvimento.

Palavras-chave: Expressão gênica. PCR em tempo real. Lignina. Sementes. Soja.

## ABSTRACT

Due to the high soybean grain yield inclusive of transgenic cultivars, there is a demand for great bulk of high quality seeds on market. It is known that the physiological quality of soybean seeds can be related to the lignin content present mainly in the tegument of the seeds. As in the literature the works related to the gene expression of lignin in soybean seeds are scarce, in the present work, studying the expression of the genes involved in the metabolic pathway of lignin during the development of those seeds was intended. Also, the ultrastructure of the teguments of the seeds as well as the physiological quality of the seeds of cultivars BRS Celeste, BRS 133 and Savana regarded as of low lignin content and BRS Valiosa, BRS Silvânia and Doko considered of high lignin content, produced in the 2008/2009 crop in the experimental area of the UFLA Agriculture Department were investigated. For the evaluation of the quality of the seeds, tests of germination, electric conductivity and accelerated ageing. Lignin content was determined and utilized in phenotypic correlation studies with the parameters used for the physiological quality analysis. For the gene expression study, the seeds were collected during the R4, R5, R6 and R7 development stages. The genes studied were PAL, CAD, C4H and C3H using as a endogenous control ELFB gene with two biological replications in triplicates for each treatment. The ultrastructural analyses revealed that the seed tegument begins to differentiate at R4 stage, reaching at R5 its complete formation divided into palisade layer, hourglass cell layer and spongy parenchyma. Increased gene expression of C4H genes occurs only at R5 and R6 development stages. The gene CAD expresses itself at the final development phases of soybean seeds and in low lignin cultivars there is greater expression of PAL at R6 and R7 development stages.

Keywords: Gene expression. Real time. Lignin. Seeds. Soybean.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	11
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
<b>2.1</b>	<b>Importância da qualidade fisiológica de sementes de soja</b> .....	13
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	23
	<b>CAPÍTULO 2 Qualidade fisiológica de sementes de soja com diferentes teores de lignina e análise ultraestrutural do desenvolvimento do tegumento das sementes por meio de microscopia de varredura</b> .....	28
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	30
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
<b>2.1</b>	<b>Obtenção das sementes</b> .....	31
<b>2.2</b>	<b>Testes de germinação e vigor</b> .....	32
<b>2.3</b>	<b>Determinação do teor de lignina no tegumento</b> .....	33
<b>2.4</b>	<b>Análise do tegumento de sementes de soja por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)</b> .....	35
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	44
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	45
	<b>CAPÍTULO 3 Expressão quantitativa relativa (qPCR) de genes envolvidos na via de biossíntese de lignina durante o desenvolvimento de sementes de soja</b> .....	47
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	49
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	51
<b>2.1</b>	<b>Obtenção das sementes</b> .....	51
<b>2.2</b>	<b>Extração do RNA</b> .....	52
<b>2.3</b>	<b>Tratamento com DNase e síntese do cDNA</b> .....	53
<b>2.4</b>	<b>Quantificação relativa</b> .....	54
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	56
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	62
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	63

## **CAPÍTULO 1**

### **1 INTRODUÇÃO GERAL**

Uma das etapas fundamentais para a obtenção de rendimentos elevados na cultura da soja é o estabelecimento de um estande adequado de plantas, conseguido principalmente por meio do uso de sementes de alta qualidade. Na safra 2009/2010 foram produzidas no país cerca de 68 milhões de toneladas de sementes dessa espécie, o que representa 60% da produção total de sementes no país. Assim, é fundamental o levantamento de fatores que interferem na qualidade fisiológica de sementes de soja, contribuindo com programas de controle de qualidade das mesmas nas etapas de melhoramento e produção de sementes.

Nesse contexto têm sido realizadas pesquisas com o objetivo de verificar a influência de lignina, biopolímero acumulado principalmente no tegumento, na qualidade fisiológica de sementes de soja. Devido às características de rigidez e hidrofobia, a lignina pode conferir resistência aos danos mecânicos, à patógenos e a deterioração em sementes. Na literatura são observados trabalhos nos quais correlacionou-se o teor de lignina e a qualidade física e fisiológica de sementes de soja. No entanto, os resultados obtidos nestas pesquisas não têm sido consistentes, o que demanda estudos mais avançados nesta área.

Nesse sentido, são escassos resultados de pesquisa relacionados à expressão gênica deste polímero em sementes, área que tem se mostrado fundamental, possibilitando o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos em processos biológicos importantes como a identificação de vias bioquímicas. Conhecimentos que poderão ser utilizados ou manipulados em programas de melhoramento vislumbrando a produção de sementes de soja com alta qualidade.

Assim, objetivou-se nesta pesquisa estudar a expressão gênica da lignina durante o desenvolvimento de sementes de soja com diferentes teores de lignina no tegumento. Foi avaliada ainda a formação do tegumento por meio das análises ultraestruturais e a correlação entre o teor de lignina no tegumento e a qualidade fisiológica das sementes.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Importância da qualidade fisiológica de sementes de soja**

A cultura da soja possui grande importância no contexto econômico brasileiro, ocupando no cenário mundial o segundo lugar em produção de grãos e o primeiro lugar em exportação.

A demanda por sementes de soja com alta qualidade é crescente no país em função de novas tecnologias incorporadas no setor. A soja é considerada uma das principais commodities agrícolas do Brasil, atingindo na safra 2009/2010 uma produção estimada em cerca de 68 milhões de toneladas de grãos (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2010).

Para atender à demanda crescente do mercado é necessário o estabelecimento adequado de estandes que possibilitem elevadas produções que são alcançadas com o uso de sementes com alta qualidade fisiológica. Assim empresas produtoras de sementes de soja tem investido em programas de controle de qualidade interno, por meio dos quais são avaliados e controlados os fatores que interferem na qualidade de sementes.

São muitos os fatores que afetam a qualidade das sementes de soja dentre eles as condições climáticas, as técnicas utilizadas durante a colheita, secagem, beneficiamento, assim como as condições de temperatura e umidade durante o transporte, armazenamento e semeadura. Quando a semente ainda se encontra no campo podem ocorrer problemas relativos à deterioração por umidade, gerando perdas significativas da qualidade. Esta pode ser apontada como uma das principais causas de deterioração das sementes podendo elevar o índice de danos mecânicos na colheita, uma vez que sementes deterioradas são extremamente vulneráveis aos impactos mecânicos (FRANÇA NETO et al., 2000).

A semi-permeabilidade do tegumento que minimiza a incidência de danos mecânicos nas sementes tem sido uma característica estudada por melhoristas de soja objetivando o aumento do potencial fisiológico dessas sementes. Essa característica reduz o efeito das flutuações de umidade do ambiente sobre a semente, principalmente nas fases de maturação e pré-colheita, e também durante o armazenamento, tornando, portanto, as sementes menos suscetíveis à deterioração (FRANÇA NETO et al., 2000).

Segundo Souza e Marcos Filho (2001), a longevidade e o potencial de deterioração no campo têm sido relacionados ao grau de permeabilidade do tegumento, que está associado ao teor de lignina. Neste contexto pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de avaliar a relação entre a qualidade e o teor de lignina presente no tegumento de sementes de soja.

Em programas de melhoramento de soja o acúmulo de lignina em tegumentos de sementes tem sido avaliado, com o objetivo de garantir a produção de sementes com alta qualidade.

## **2.2 Estrutura e lignificação do tegumento das sementes**

O tegumento é um dos principais fatores determinantes da capacidade de germinação, vigor e potencial de longevidade das sementes. É originado dos integumentos do óvulo onde a primina dá origem à testa e a secundina origina o tegma. Por meio de um corte transversal da testa distingue-se três camadas: a epiderme que é formada pelas células paliçádicas ou macroesclerídeos, a hipoderme, formada pelas células em ampulheta, ou osteoesclerídeos ou células pilares e as células parenquimatosas (SWANSON; HUGHES; RASMUSSEN, 1985).

O tegumento apresenta função de proteção durante a embebição, evitando a ruptura celular e perda de substâncias intracelulares (DUKE;

KAKEFUDA, 1981), e também protege o eixo embrionário (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

O tegumento das sementes exerce também, função importante no processo de germinação pois é um fator regulador da absorção de água (MCDONALD; VERTUCCI; ROOS, 1988). Algumas características morfológicas do tegumento podem influenciar o tempo de penetração da água pela interferência exercida no mecanismo de controle de troca de umidade (COSTA et al., 1994).

A inclusão de lignina na parede celular tem origem na lamela média, partindo em direção ao interior da parede secundária. Inicialmente, ocorre o crescimento da parede primária que corresponde à fase em que a célula aumenta de tamanho, e depois o crescimento da parede secundária, fase em que a parede celular torna-se progressivamente mais espessa, a partir da borda interna da parede primária, em direção ao centro da célula, ocorrendo a deposição de polímeros de lignina. O efeito deste padrão de deposição de lignina torna a região lamela média/parede celular primária mais intensamente lignificada (JUNG; ALEN, 1995).

A lignina é depois da celulose, o polímero mais abundante encontrado nas plantas. Trata-se de polímeros vegetais derivados dos alcoóis hidroxicinâmílicos p-coumarílico, coniferílico e sinapílico, também chamados de monolignóis. Devido a sua rigidez e hidrofobia favorecer a resistência aos danos mecânicos, transporte da água e a defesa contra ataques de patógenos (LEWIS; YAMAMOTO, 1990).

O teor de lignina considerado adequado varia de acordo com a espécie e o órgão analisado. O alto teor de lignina presente na parte aérea de forrageiras determina a baixa digestibilidade, formando assim pastagens de baixa qualidade para os animais (LACERDA, 2001) enquanto que em eucalipto, o alto teor de



lignina presente nos tecidos do caule prejudica a obtenção de celulose e papel (ENDT et al., 2000).

Recentemente em pesquisas envolvendo bioscombustíveis também buscam entender a função e evolução de genes de biossíntese de lignina com o objetivo de desenvolver melhores estratégias para a melhoria de matéria-prima para bioenergia (XU et al., 2009).

Diferenças no teor de lignina entre tegumentos de sementes têm sido observadas por diversos autores (ALVAREZ et al., 1997; CARBONELL; KRZYZANOWSKI, 1995; GRIS et al., 2010; MENEZES et al., 2009; PANOBIANCO, 1997). Panobianco (1997), estudando a variação na condutividade elétrica de sementes de diferentes genótipos de soja e sua relação com o conteúdo de lignina no tegumento, concluiu que o efeito do genótipo pode ser consequência das características do tegumento da semente.

Menezes et al. (2009), realizaram a avaliação da espessura de lignina nos tegumentos das sementes de soja de diferentes cultivares por meio da microscopia de luz onde foi observada a presença de lignina no tegumento de sementes nas camadas de células paliçádicas e de células em ampulheta.

Em sementes de soja já foram verificadas correlações positivas entre o alto teor de lignina no tegumento e a resistência aos danos mecânicos. No entanto ainda não está esclarecido a relação entre o teor de lignina e a espessura da testa (AGRAWAL; MENON, 1974; TAVARES et al., 1987). A espessura da testa é uma característica física uniforme em sementes de uma mesma cultivar e tem controle genético (CAVARIANI et al., 2009).

Diferenças estruturais já foram encontradas entre tegumentos de sementes de soja de coloração preta e amarela, onde as sementes com tegumento preto apresentaram qualidade fisiológica superior em relação às sementes com tegumento amarelo. Observou-se que as células da epiderme da testa do tegumento de sementes pretas apresentaram-se com aspecto serrilhado, enquanto

que nas sementes amarelas, essas células permaneceram com a estrutura lisa. O genótipo de sementes de tegumento com coloração preta possui as células da epiderme da testa altamente lignificadas conferindo assim, maior resistência (MERTZ et al., 2009).

Alguns pesquisadores já estudaram as propriedades do tegumento da semente de soja (MA et al., 2004; SOUZA; MARCOS-FILHO, 2001), mas ainda não foi comprovado quais estruturas do tegumento estão associadas à permeabilidade. Substâncias impermeáveis à água tais como ceras, suberina, tanino ou lignina podem ser encontrados na parede celular (MCDOUGALL et al., 1996).

### **2.3 Expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de lignina**

A síntese de lignina envolve várias enzimas e o conhecimento dessas é importante em estudos nos quais se relaciona a qualidade de sementes de soja e o teor de lignina.

As plantas são responsáveis pela produção de metabólitos secundários que oferecem inúmeras funções. Os principais metabólitos secundários são os terpenos, os compostos fenólicos e alcalóides.

A complexidade das vias de biossíntese de lignina é atribuída a várias enzimas multifuncionais, e estas enzimas também correspondem a famílias de genes diferentes (XU et al., 2009).

As enzimas que participam das etapas iniciais e intermediárias da via de biossíntese da lignina são comuns à via dos fenilpropanóides (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). O metabolismo dos fenilpropanóides inclui uma série complexa de rotas bioquímicas que proporcionam às plantas milhares de combinações. Muitos destes são intermediários na síntese de substâncias

estruturais das células, como a lignina (BOATRRIGHT et al., 2004). Os fenilpropanóides se formam a partir do ácido chiquímico, que formam as unidades básicas dos ácidos cinâmicos e *p*-cumárico (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Uma quantidade considerável de genes é atribuída como participante da síntese da lignina, tais como os genes reguladores da atividade das enzimas phenylalanine ammonia-lyase (PAL), Cinamato-4Hidroxilase (C4H), 4-cumarate-CoA ligase (4CL), 4 Hidroxicinamato 3-Hidroxilase (C3H), 5-Adenosil-Metionine:Cafeato/5-Hidroxi (OMT), Ferulato-5-Hidroxilase (F5H), Hidroxicinamoil COA Redutase (CCR), cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) (BOUDET, 2000, 2003; DARLEY et al., 2001).

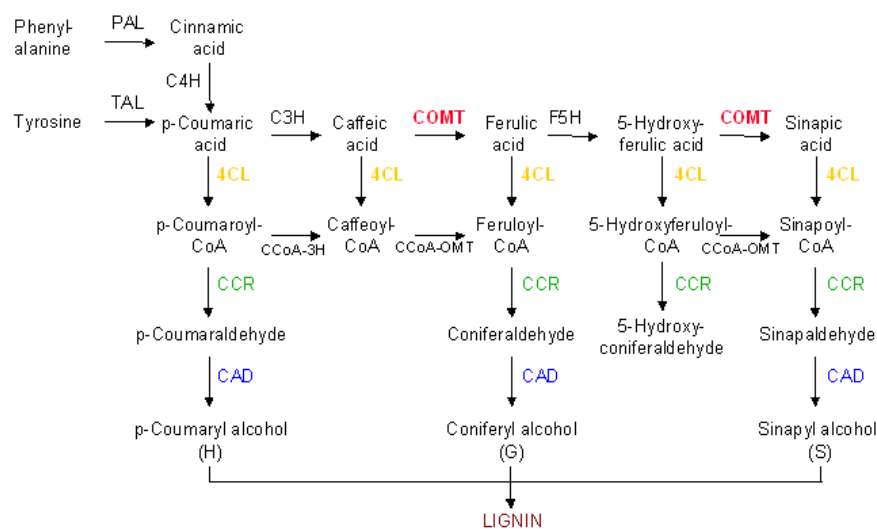


Figura 1 Via da biossíntese de lignina

A classe mais abundante de compostos fenólicos é derivada da fenilalanina, por meio da eliminação de uma molécula de amônia para formar o ácido cinâmico, cuja reação é catalisada pela enzima fenilalanina amônia-liase

(PAL). Essa é uma das principais enzimas que atuam na formação dos precursores da lignina, catalisando a desaminação da fenilalanina a ácido trans-cinâmico (RAES et al., 2003). Segundo Bate et al. (1994) e Sewalt et al. (1997) a PAL se torna limitante quando sua atividade é reduzida, cujos resultados foram comprovados em tabaco transgênico (*Nicotiana tabacum*).

A invasão de patógenos, por exemplo, desencadeia a transcrição do RNAm, que codifica a enzima PAL, aumentando a quantidade desta enzima na planta e estimulando a síntese de compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Esta enzima é chave da via metabólica dos fenilpropanóides, e além de fazer parte da classe de enzimas envolvida na formação de lignina, cujo acúmulo na parede celular é concomitante com o aumento na atividade de PAL, também pode ser induzida por agente biótico ou abiótico (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005).

A Cinamato-4Hidroxilase (C4H) controla a conversão do cinamato em *p*-cumarato. É o primeiro citocromo monooxigenase P450-dependente do caminho do fenilpropanóide. São catalisadas três reações de hidroxilação sucessivas no anel na formação do monolignol, começando pela enzima C4H, seguindo pela C3H e a F5H (DIXON et al., 2001).

Outra enzima importante é a cinamil álcool desidrogenase (CAD), a qual catalisa o último passo na biossíntese do monolignol, reduzindo-as a aldeídos e em álcoois correspondentes. A enzima CAD reduz vários aldeídos, durante diferentes fases de desenvolvimento de plantas. Além da função de regulação da lignificação, vários genes da CAD foram caracterizados em resposta a patógenos em plantas (KIEDROSKI et al., 1992). Pela sua alta especificidade é considerada como marcadora do processo de lignificação.

Também fazendo parte da biossíntese de lignina a 4-Hidroxicinamato 3-Hidroxilase (C3H) foi nomeada originalmente depois de sua função na hidroxilação do ácido *p*-cumárico. Recentemente foi observado que a C3H1

converte éster cuiquimato e quinato de ácido *p*-cumárico preferencialmente no ácido cafeico correspondente, considerando que ácido *p*-cumárico e *pcumaroil* - CoA não sejam substratos desta enzima (FRANKE et al., 2002; NAIR et al., 2002; SCHOCH et al., 2001).

Indícios de que outros genes podem contribuir de forma determinante para a síntese de lignina foram encontrados quando plantas mutantes ou geneticamente modificadas apresentaram unidades não usuais deste polímero, levando à hipótese que em condições específicas sua síntese pode ser alcançada por diferentes vias e precursores envolvendo assim uma grande variedade de genes (RAES et al., 2003).

Em vários trabalhos tem sido mostrada a importância de estudos em plantas no nível molecular para o melhor entendimento de como os genes se expressam. Recentemente, estudos de mapeamento de transcriptoma de plantas se tornaram uma ferramenta importante em estudos de variação genotípica e fenotípica sob diferentes condições (NUSSBAUMER et al., 2009). A variação da regulação gênica mostra-se um mecanismo importante em sementes, em função da complexidade dos fatores que interferem na qualidade das mesmas.

Segundo Souza e Marcos Filho (2001) o uso da biotecnologia em estudos do tegumento de sementes visando a melhor qualidade e produção ainda não avançaram muito devido à falta de conhecimento dos sistemas genéticos que controlam o desenvolvimento e composição do mesmo. Um grande número de genes são conhecidos por serem especificamente expressos nos tecidos do tegumento e no entanto, pouco se conhece sobre a funcionalidade dos mesmos. No tegumento são sintetizados novos compostos relacionados a defesa e controle do desenvolvimento de sementes.

Muitos eventos relacionados ao crescimento, desenvolvimento de plantas ou até mesmo em resposta a vários estímulos são resultantes da alteração na expressão gênica. A determinação qualitativa e quantitativa dos níveis de

transcritos de células vegetais permite que genes, diferencialmente expressos possam ser identificados, e conseqüentemente, sua função metabólica pode ser investigada (KUHN et al., 2001).

Atualmente existem várias técnicas por meio das quais é possível avaliar a expressão de genes associados à qualidade de sementes.

A maximização da sensibilidade dos métodos de quantificação tem levado ao desenvolvimento de técnicas cada vez mais avançadas, dentre elas o PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR), que já é usado há bastante tempo na área médica. No entanto, mais recentemente tem sido utilizada em estudos de expressão gênica e quantificação de seqüências específicas em plantas (GACHON; SAINDRENAN, 2004). De modo geral, a investigação da expressão gênica em plantas, tem facilitado o conhecimento e o entendimento de genes e vias metabólicas.

O qPCR difere do PCR clássico pela mensuração do produto de PCR amplificado em cada ciclo da reação da PCR. Na prática, uma câmera de vídeo grava a luz emitida por sondas fluorogênicas ou por agentes intercalantes de fitas duplas de DNA, como o SYBR Green, que é incorporado dentro dos novos produtos amplificados. Assim, o qPCR permite que a amplificação seja acompanhada em tempo real, durante a fase exponencial da corrida, fazendo com que a quantidade de material inicial seja determinada precisamente. Comparado com outras técnicas, esta permite a detecção de um dado ácido nucléico alvo de maneira rápida, específica e muito sensível (GACHON; SAINDRENAN, 2004).

A quantificação é a característica mais importante do qPCR. A quantificação absoluta é calculada com auxílio de uma curva padrão. A quantificação relativa pode ser deduzida considerando diferenças de Ct (cycle threshold) entre as amostras e padrões de expressão constitutiva (BUSTIN, 2000). Comparada com o PCR clássico, uma das principais vantagens do qPCR é a

rapidez em fornecer dados confiáveis. É altamente sensível na detecção de DNA ou RNA devido á combinação de amplificação realizada pelo passo de PCR e o sistema de detecção. Em qualquer caso a especificidade do processo pode ser checada depois da completa corrida de PCR, por gel de eletroforese, curva de dissociação e dados de sequenciamento. É uma técnica muito conveniente para estudos com limitada quantidade de material inicial ou para avaliar a expressão de um grande número de genes com quantidades mínimas de RNA (FREEMAN; WALKER; VRANA, 1999).

Na ciência básica, o qPCR tem sido amplamente empregado na quantificação de transcritos específicos (RT-q PCR), na análise de famílias multigênicas. Diante do exposto a técnica de PCR em tempo real pode ser utilizada para se estudar a expressão de genes associados à qualidade fisiológica das sementes, a exemplo das envolvidas na síntese de lignina.

## REFERÊNCIAS

AGRAWAL, K.; MENON, K. Lignin content and seed coat thickness in relation to seedcoat cracking in soybean. **Seed Research**, New Delhi, v. 2, p. 64-66, 1974.

ALVAREZ, P. J. C. et al. Relationship between soybean seed coat lignin content and resistance to mechanical damage. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 25, n. 2, p. 209-214, Feb. 1997.

BATE, N. J. et al. Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. **Proceedings National Academy Science**, Washington, v. 91, n. 16, p. 7608-7612, Aug. 1994.

BOATRIGT, J. et al. Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 135, n. 4, p. 1993-2011, July 2004.

BOUDET, A. M. Lignins and lignification: selected issues. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 38, n. 1/2, p. 81-96, Feb. 2000.

\_\_\_\_\_. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n. 8, p. 576-581, Aug. 2003.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 25, n. 2, p. 169-193, Oct. 2000.

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

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.

CAVARIANI, C. et al. Velocidade de hidratação em função de características do tegumento de sementes de soja de diferentes cultivares e localidades. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 31-39, jan./fev. 2009.



COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos safra 2009/2010**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 7 maio 2010.

COSTA, N. P. et al. Zoneamento ecológico do estado do Paraná para produção de sementes de cultivares precoces de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 16, n. 1, p. 12-19, jan./mar. 1994.

DARLEY, C. P. et al. The molecular basis of plant cell wall extension. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, n. 1/2, p. 179-195, Sept. 2001.

DIXON, R. A. et al. The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid”, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, n. 7, p. 1069-1084, Aug. 2001.

DUKE, S. H.; KAKEFUDA, G. Role of the testa in preventing cellular rupture during imbibition of the legume seeds. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 67, n. 2, p. 449-456, Mar. 1981.

ENDT, D. V. et al. Genes de lignificação. **Biotecnologia, Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 3, n. 15, p. 152-159, 2000.

FRANÇA-NETO, J. B. et al. Tecnologia de produção de sementes. In: \_\_\_\_\_. **A cultura da soja no Brasil**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 2000. 1 CD-ROM.

FRANKE, R. et al. Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 47-59, Jan. 2002.

FREEMAN, W. M.; WALKER, S. J.; VRANA, K. E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **Biotechniques**, Natick, v. 26, n. 1, p. 112-122, Jan. 1999.

GACHON, C.; SAINDRENAN, P. Real-time PCR monitoring of fungal development in Arabidopsis thaliana infected by Alternaria brassicola and Botrytis cinerea. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 5, p. 367-371, May 2004.

GRIS, C. F. et al. Qualidade fisiológica e teor de lignina no tegumento de sementes de soja convencional e transgênica RR submetidas a diferentes épocas de colheita. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 374-381, mar./abr. 2010.

JUNG, H. G.; ALLEN, M. S. Characteristics of plants cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 9, p. 2774-2790, Sept. 1995.

KIEDROWSKI, S. et al. Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly depended on the Arabidopsis RPMJ disease resistance locus. **EMBO Journal**, Oxford, v. 11, n. 13, p. 4677-4684, Dec. 1992.

KUHN, H. et al. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. **The Plant Journal**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 503-528, 2001.

LACERDA, R. S. **Teores de lignina estimados através do método espectrofotométrico:** lignina solúvel em brometo de acetila de alguns cultivares de aveia. 2001. 75 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

LEWIS, N. G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 455-496, Nov. 1990.

MA, E. et al. Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability to water. **Annals of Botany**, London, v. 44, n. 2, p. 213-228, Feb. 2004.

MCDONALD, M. B.; VERTUCCI, C. W.; ROOS, E. C. Soybean seed imbibition: water absorption by seed parts. **Crop Science**, Madison, v. 28, n. 6, p. 993-997, June 1988.

MCDUGALL, G. J. et al. Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 70, n. 2, p. 133-150, Apr. 1996.

MENEZES, M. et al. Aspectos químicos e estruturais da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1716-1723, dez. 2009.

MERTZ, L. M. et al. Diferenças estruturais entre tegumentos de sementes de soja com permeabilidade contrastante. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 23-29, jan. 2009.

NAIR, R. B. et al. Arabidopsis CYP98A3 mediating aromatic 3-hydroxylation: developmental regulation of the gene, and expression in yeast. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 130, n. 1, p. 210-220, Sept. 2002.

NUSSBAUMER, C. et al. Comprehensive analysis of Arabidopsis expression level polymorphisms with simple inheritance. **Molecular and System Biology**, Dordrecht, v. 5, n. 242, p. 1-10, 2009.

PANOBIANCO, M. **Variação na condutividade elétrica de sementes de diferentes genótipos de soja e relação com o conteúdo de lignina no tegumento**. 1997. 59 f. Dissertação (Mestrado em Produção e Tecnologia de Sementes) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

RAES, J. et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in arabidopsis. **Plant Physiology**, Washington, v. 133, n. 3, p. 1051-1071, Mar. 2003.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, mar./abr. 2003.

SCHOCH, G. et al. CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 30-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. **Journal of Biology Chemistry**, Oxford, v. 276, n. 39, p. 36566-36574, Sept. 2001.

SEWALT, V. J. H. et al. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonialyase or cinnamate 4-hydroxylase. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 115, n. 1, p. 41-50, Sept. 1997.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos volateis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004. cap. 18, p. 467-496.

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

SWANSON, B. G.; HUGHES, J. S.; RASMUSSEN, H. Seed microstructure: review of water imbibition in legumes. **Food Microstructure**, Chicago, v. 4, p. 115-124, 1985.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAVARES, D. Q. et al. Características estruturais do tegumento de sementes de linhagens de soja permeável e impermeável. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 147-153, abr./jun. 1987.

XU, Z. et al. Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom. **BMC Bioinformatics**, New York, v. 10, n. 11, p. 1-15, Oct. 2009. Supplement.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advance**, New York, v. 23, n. 4, p. 283-333, June 2005.

## **CAPÍTULO 2**

### **Qualidade fisiológica de sementes de soja com diferentes teores de lignina e análise ultraestrutural do desenvolvimento do tegumento das sementes por meio de microscopia de varredura**

#### **RESUMO**

A cultura da soja tem destaque no cenário econômico do país, colocando o Brasil como segundo maior produtor e maior exportador mundial de grãos. Para atender a demanda crescente é necessário a produção de sementes com alta qualidade fisiológica. Sabe-se que a qualidade fisiológica de sementes de soja pode estar relacionada ao teor de lignina presente no tegumento das sementes. No presente trabalho objetivou-se avaliar a qualidade fisiológica de sementes de soja com diferentes teores de lignina assim como analisar a espessura de lignina presente nas camadas da testa do tegumento. As sementes foram multiplicadas na safra 2008/2009 sob sistema de plantio direto na área experimental do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. As sementes foram submetidas aos testes de germinação, envelhecimento acelerado e condutividade elétrica. Foi feita a correlação fenotípica entre o teor de lignina presente no tegumento das sementes e as variáveis utilizadas para avaliação da qualidade fisiológica. A análise ultraestrutural do tegumento foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura. O tegumento de sementes de soja formado pela epiderme, hipoderme e o parênquima lacunoso se encontra formado e definido a partir do estágio R5 de desenvolvimento. Há indícios de relação entre a espessura das camadas paliçádicas e em ampulheta e o vigor de sementes avaliado pelo teste de condutividade elétrica.

Palavras-chave: Qualidade fisiológica. Microscopia. Sementes. Soja.

## ABSTRACT

Soybean cultivation stands out in the economic scenario of the country, putting Brazil as the second greatest producer and the greatest exporter of grains of the world. To meet the growing demand, the production of seeds of high physiological quality is necessary. It is known that the physiological quality of soybean seeds may be related to the lignin content present in the tegument of seeds. In the present work, evaluating the physiological quality of soybean seeds with different lignin contents as well as to study the thickness of the lignin present in the testa layer of the tegument was aimed. The seeds were multiplied in the 2008/2009 crop under the no-tillage system in the experimental area of the Agricultural Department of the Federal University of Lavras. The seeds were submitted to the tests of germination, accelerated ageing and electric conductivity. The phenotypic correlation between the lignin content present in the seeds' tegument and the variables utilized for evaluation of the physiological quality was done. The ultrastructural analysis of the tegument was performed by means of scanning electron microscopy. The tegument of the soybean seeds made up of the epidermis, hypodermis e spongy parenchyma is already formed and definite from R5 development stage on. There are clues of relationship between the thickness of the palisade and hourglass layers and the vigor of seeds evaluated by the electric conductivity test.

Keywords: Physiological quality. Microscopy. Seeds. Soybean.

## 1 INTRODUÇÃO

Na cultura da soja a incorporação de tecnologias desenvolvidas relacionadas à melhoria do complexo ambiental e do potencial genético das cultivares é eminente. Isso reflete no aumento expressivo da produtividade média desta cultura no país, que na safra 1976/1977 era de 1748 kg.ha e que na atual safra 2009/2010, supera os 2800 kg.ha (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2010).

Para que sejam atendidas as demandas crescentes de produção, é indispensável a utilização de sementes com alto potencial fisiológico, além dos atributos físicos, genéticos e sanitários. Para isso, é imprescindível conhecer e controlar os fatores que interferem na qualidade de sementes de soja.

Em algumas pesquisas tem sido relatada a correlação positiva entre a qualidade das sementes de soja e o teor de lignina presente no tegumento das mesmas, o que desperta o interesse, por parte dos melhoristas, em se utilizar nos programas de melhoramento genótipos de soja com certa rigidez na camada da testa. Essa característica apresenta como vantagens a proteção contra danos mecânicos, assim como ataques de patógenos, redução das flutuações de umidade, controle da velocidade de hidratação da semente, maior resistência a deterioração no campo e maior potencial de armazenamento.

O tegumento das sementes é originado dos integumentos do óvulo, onde a primina dá origem à testa e a secundina origina o tegma. No entanto, ainda não está esclarecido a relação entre o teor de lignina e a espessura da testa, considerada característica física uniforme em sementes de uma mesma cultivar e que tem controle genético.

Nesse sentido, objetivou-se neste trabalho avaliar a qualidade fisiológica de sementes de soja com diferentes teores de lignina e o desenvolvimento do tegumento por meio de microscopia de varredura.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção das sementes

O trabalho foi realizado na área experimental e no Laboratório Central de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura e no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Sementes das cultivares BRS Silvânia RR, BRS Valiosa RR, BRS Celeste, BRS 133, Doko e Savana foram produzidas em área com solo classificado como Latossolo Roxo distroférico realizando-se a semeadura em sistema de plantio direto.

A cidade de Lavras encontra-se na região sul do estado de Minas Gerais que segundo classificação de Koppen apresenta clima tipo Cwa (OMETO, 1981). Está situada a uma altitude de 918m, a 21°14 de latitude sul e 45°00 de longitude oeste.

As cultivares utilizadas com diferentes teores de lignina no tegumento das sementes foram cedidas pela Embrapa Soja (Tabela 1).

Tabela 1 Cultivares de soja com diferentes teores de lignina no tegumento utilizadas em ensaio de produção de sementes, safra 2008/2009

Cultivares	Lignina g% (Baixo teor)	Ciclo	Cultivares	Lignina g% (Alto teor)	Ciclo
BRS 133	0,16	Semiprecoce	BRS Silvânia RR	0,40	Semitardio
BRS Celeste	0,20	Médio	BRS Valiosa RR	0,30	Médio
Savana	0,22	Tardio	Doko	0,35	Tardio

De acordo com a análise de solo foi feita a adubação de semeadura conforme recomendações de Ribeiro, Guimarães e Vicente (1999). No tratamento das sementes foi utilizado o fungicida Vitavax Thiram 200 SC na



dosagem de 250 ml/100kg de sementes. Em seguida as sementes foram inoculadas com produto comercial turfoso, objetivando garantir uma população mínima de 1200000 bactérias/semente.

A multiplicação das sementes foi realizada no delineamento em blocos casualizados com três repetições. As unidades experimentais constaram de 4 linhas de 5m cada, sendo consideradas apenas as 2 linhas centrais como área útil. O desbaste foi realizado mantendo-se uma população de 16 plantas por metro linear.

A colheita manual foi realizada quando as plantas se encontravam nos estádios R7 e R8 segundo Fehr e Caviness (1977). A secagem foi feita à sombra até as sementes atingirem 13% de grau de umidade.

As sementes foram classificadas em peneiras de crivo circular 5,55mm e 6,35 mm para uniformização do tamanho das sementes para posterior realização das avaliações.

## **2.2 Testes de germinação e vigor**

Para a realização dos testes de germinação e envelhecimento acelerado as sementes foram tratadas com fungicida Vitavax Thiram 200SC na dosagem de 250ml/kg de sementes. Utilizou-se em ambos os testes 300 sementes por cultivar. No teste de germinação as sementes foram semeadas entre papel tipo Germitest umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel, visando umedecimento adequado e uniformização do teste. As sementes permaneceram no germinador regulado para  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ . As avaliações foram realizadas aos cinco dias (primeira contagem) e oito dias (contagem final), computando-se a porcentagem de plântulas normais, segundo os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de sementes (BRASIL, 1992).

Já para o teste de envelhecimento acelerado, o método utilizado foi o de mini câmaras do tipo “gerbox”, em que 42g de sementes foram distribuídas sobre uma tela suspensa no interior da caixa contendo 40 mL de água e submetidas a temperatura de 42°C durante 72 horas. Em seguida, foi realizado o teste de germinação segundo Vieira e Carvalho (1994) com 6 repetições de 50 sementes para cada cultivar.

Para a realização do teste de condutividade elétrica foram utilizadas quatro amostras de 50 sementes, para cada cultivar, aparentemente intactas e pesadas. Em seguida, foram colocadas em copos de plásticos (capacidade de 200 ml) contendo 75 mL de água deionizada durante 24 horas à temperatura de 25°C. Por meio de um condutivímetro de massa, marca DIGIMED, modelo CD 21A, foi efetuada a leitura da condutividade da solução de embebição das sementes de cada cultivar e os resultados expressos em  $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$  de sementes (VIEIRA ; CARVALHO, 1994).

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Sisvar (FERREIRA, 2003) e os dados foram submetidos ao teste F e quando significativos empregou-se o teste de Scott-Knott (1974) para comparação das médias.

### **2.3 Determinação do teor de lignina no tegumento**

Os tegumentos das diferentes cultivares foram removidos e macerados em cadinho usando-se nitrogênio líquido. As amostras foram lavadas 2 vezes com 1,5 mL de triton e centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 min, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 1,5 mL de água destilada e novamente centrifugado a 10.000 rpm, por 10 min, descartando-se o sobrenadante. Em seguida, foram secadas por 8 h em liofilizador (*Integrated SpeedVac System* modelo L 101, marca Liobras). Deste material liofilizado, 30

mg foram pesados e armazenados em dessecador para posterior análise de lignina.

Um volume de 1,5 mL de metanol 80% foi adicionado aos 30 mg de tegumento, agitado por 15 horas em agitador rotativo em temperatura ambiente e centrifugado a 12.000 rpm, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi secado a 65 °C, por 4 h. O resíduo seco insolúvel em metanol, contendo lignina e ácidos fenólicos esterificados da parede celular, foi utilizado para determinação de lignina, de acordo com metodologia de Barber e Ride (1988), com algumas modificações. Para tanto, um volume de 1,5 mL de solução contendo ácido tioglicólico e HCl 2M (proporção de 1:10) foi adicionado ao resíduo. Os microtubos foram agitados suavemente para a hidratação do resíduo e então colocados em banho-maria a 100°C, por 4 h. Após, os microtubos foram colocados em gelo para resfriar rapidamente por 10 min e então centrifugados a 10.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1,5 mL de água destilada e deionizada e novamente centrifugado a 10.000 rpm, por 10 min. Logo após, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 1,5 mL de NaOH 0,5 M, sendo a mistura agitada em agitador rotativo, por 15 h, em temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm, por 10 min e o sobrenadante foi transferido para novo microtubo, no qual foram adicionados 200 µL de HCl concentrado e mantido em câmara fria (4 °C), por 4 h, para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico. A seguir, a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm, por 10 min, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensão em 1,5 mL de NaOH 0,5 M. A absorvância desta solução foi determinada a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina, sendo expresso em mg de lignina por grama de tecido seco. A análise do teor de lignina foi realizada em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições e as médias foram comparadas pelo teste de Scott e Knott (1974) a 5% de probabilidade.

A estimativa da correlação fenotípica entre o teor de lignina e os parâmetros utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes foi determinada entre os caracteres dois a dois, pela expressão proposta por Falconer e Mackay (1996):

$$r(xy) = \frac{COV_{xy}}{\sqrt{\sigma_x^2 \sigma_y^2}}$$

em que:

$r(xy)$ : correlação fenotípica entre os caracteres x e y.

$COV[x, y]$ : estimativa da covariância fenotípica entre os caracteres x e y.

$\sigma_x^2$  e  $\sigma_y^2$ : variância fenotípica entre os caracteres x e y obtidas a partir das análises de variância estrutural.

#### **2.4 Análise do tegumento de sementes de soja por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Os tegumentos foram retirados de sementes nos estádios de desenvolvimento R4, R5, R6 e R7 e cortados em nitrogênio líquido.

Os tegumentos foram colocados em fixador primário Karnovsky modificado (Glutaraldeído 2,5%, Formaldeído 2,5 % em tampão Cacodilato de sódio 0,05 M pH 7,2 e  $CaCl_2$  0,001 M), onde permaneceram por 48 horas. Para a avaliação da espessura das camadas das células paliçádicas e das células em ampulheta, os tegumentos foram colocados em glicerol por 30 minutos e depois cortados transversalmente com bisturi em nitrogênio líquido para subsequente série de três lavagens de 10 min em tampão Cacodilato de sódio 0,05 M e posterior fixação secundária em tetróxido de ósmio 1% (3 gotas/amostra) em tampão Cacodilato 0,05 M pH 7,2, por 1 hora. Após a segunda fixação, os tegumentos foram lavados em água destilada por três vezes e submetidos à

desidratação em série de acetona. O tempo de exposição dos tegumentos às soluções foi de 10 minutos para cada concentração de acetona, em ordem crescente de concentração (25%, 50%, 75%, 90% e 100%). Uma vez desidratado, o material foi submetido à secagem ao ponto crítico no secador CPD 030 e posterior banho de ouro no evaporador SCD 050. A visualização das amostras para determinação da espessura das camadas das células paliçádicas e das células em ampulheta foi feita em microscópio eletrônico de varredura LEO Evo 40 (ALVES, 2004).

Para a análise da espessura das camadas das células paliçádicas e das células em ampulheta empregou-se o delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições e as médias foram comparadas pelo teste de Scott e Knott (1974) a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos resultados da análise de variância houve diferença significativa entre as cultivares para a qualidade fisiológica das sementes de soja, avaliada por meio de testes de germinação e de vigor. Menores valores de germinação foram observados em sementes das cultivares Savana, BRS Valiosa RR e BRS Silvânia RR e maiores valores naquelas das cultivares BRS Celeste, Doko e BRS 133.

Já no teste de envelhecimento acelerado menor vigor foi observado em sementes da cultivar Doko, em relação às demais cultivares avaliadas. Tanto no teste de germinação quanto no de envelhecimento acelerado foram observados baixos valores de coeficiente de variação, o que pode explicar a significância estatística de valores muito próximos. Os valores de plântulas normais observados nos testes de germinação e vigor foram iguais ou superiores a 96%. No teste de envelhecimento acelerado as sementes são expostas às condições de elevada temperatura e umidade relativa, condição diferente do teste de germinação no qual as sementes são germinadas sob condições favoráveis à espécie. Ressalta-se que durante o desenvolvimento e na pré-colheita das sementes as condições climáticas foram favoráveis, o que explica a alta qualidade fisiológica das sementes.

Em várias pesquisas tem sido relatado que a incidência de chuvas e altas temperaturas afetam a qualidade fisiológica das mesmas, durante o processo de maturação e pré-colheita. Portanto, sob condições desfavoráveis de temperatura e umidade relativa durante o processo de produção de sementes a seleção de cultivares com alta qualidade fisiológica é mais segura. Pelo teste de Condutividade Elétrica maiores valores de vigor foram observados em sementes das cultivares BRS Valiosa RR, BRS Celeste e Doko.

De acordo com Vieira e Krzyzanowski (1999), os valores padrões de condutividade a serem considerados devem ser de 70-80 $\mu$ S.cm<sup>-1</sup> indicando de alta para média qualidade de sementes de soja. Os valores de condutividade elétrica encontrados neste trabalho foram bem inferiores ao padrão referido evidenciando o bom desempenho das cultivares, o que também pode ser explicado pelas condições favoráveis durante o processo de produção das sementes.

Em valores absolutos menor valor de condutividade foi observada em sementes da cultivar Doko. Essa cultivar tem sido classificada em programas de melhoramento de soja com alta qualidade fisiológica de sementes (KASTER et al., 1989). Sementes dessa cultivar apresentam teor de lignina médio de 0,35%, valor considerado alto.

Tabela 1 Avaliação da qualidade fisiológica das sementes das seis cultivares estudadas: teste de germinação (TG), condutividade elétrica (CE), envelhecimento acelerado (EA)

Cultivar	TG(%)	EA(%)	CE( $\mu$ S cm <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )
Savana	96.0 b	99,0 a	46,01b
BRS Valiosa RR	96.0 b	99,0 a	38,2 a
BRS Silvânia RR	97.0 b	99,0 a	49,4 b
BRS Celeste	99.0 a	99,0 a	37,9 a
Doko	99.0 a	96,0 b	37,3 a
BRS 133	99.0 a	99,0 a	46,4 b
CV(%)	1,99	1,52	10,97

Na coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Em alguns trabalhos tem sido relacionada a alta qualidade fisiológica das sementes de soja com o alto teor de lignina presente no tegumento (PANOBIANCO et al., 1999). Na presente pesquisa foi avaliada a correlação fenotípica entre o teor de lignina e os parâmetros adotados para a avaliação da qualidade das sementes. Houve correlação baixa e negativa entre o teor de lignina e a germinação das sementes (-0,35). Para os demais testes essa

correlação não foi significativa. Assim não houve correlação entre o teor de lignina e a qualidade fisiológica das sementes. No entanto foi observado por Menezes et al. (2009) correlações positivas entre o teor de lignina e a germinação das sementes.

Além do teor de lignina, a espessura do tegumento, caracterizada pelas espessuras das camadas de células paliçádicas e células em ampulheta, também podem estar associadas à qualidade fisiológica das sementes. Os dados de espessura das camadas em ampulheta e paliçádica do tegumento das sementes estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 Teor de lignina (L) e espessura das camadas de células paliçádicas (CP), células em ampulheta (CA) e do conjunto de células paliçádicas e em ampulhetas (CPA) das sementes de soja no estágio R7 obtidos em microscopia eletrônica de varredura. UFLA, Lavras – MG, 2010

Cultivares	L (g%)	CP	CA	CPA
BRS Silvânia	0,40 a	46,86 b	32,34 c	79,10 c
BRS Valiosa	0,30 a	47,03 b	51,12 b	98,40 b
BRS Celeste	0,22 b	44,85 b	39,89 c	84,70 c
BRS 133	0,16 b	45,40 b	46,89 b	92,40 b
Savana	0,20 b	49,63 a	59,51 a	109,10 a
Doko	0,35 a	51,10 a	70,22 a	121,40 a
CV %	10,11	6,79	29,92	15,76

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Maiores espessuras das camadas de células paliçádicas e em ampulheta e do conjunto de ambas foram observadas em tegumentos de sementes das cultivares Savana e Doko. Por meio das análises ultraestruturais obtidas por microscopia de luz, foi observado que a lignina é depositada nessas duas camadas (MENEZES et al., 2009).

Comparando-se os resultados observados no teste de condutividade elétrica em sementes da cultivar Doko com os dados de teor de lignina e da espessura das camadas paliçádica e em ampulheta, onde a lignina está presente,



parece existir relação entre os dados de condutividade elétrica, com menor lixiviação de exsudatos, e o maior espessamento das camadas do tegumento.

Posteriormente para a cultivar BRS Silvânia RR, foi observado alto valor de condutividade elétrica e menores valores de espessura das camadas em ampulheta e do conjunto de células paliçádicas e em ampulheta. Assim infere-se que a restrição à absorção de água pode estar associada à espessura das camadas em referência. Mediante trabalho para a avaliação da relação entre a velocidade de hidratação e a espessura e o teor de lignina do tegumento de sementes de soja, Cavariani et al. (2009) verificaram que a espessura do parênquima lacunoso relacionou-se significativamente com a velocidade de hidratação das sementes.

Segundo Silva (2003), o parênquima lacunoso possui de 6 a 8 camadas de células e no processo de absorção, a água teria que percorrer uma distância maior devido a essa camada mais espessa de células.

Por meio das análises ultraestruturais as quais foram realizadas nos estádios R4, R5, R6, e R7 de desenvolvimento das sementes, observou-se que as camadas que compõem o tegumento das sementes de soja começam a ser formadas no estágio R4. Segundo Esaú (1976) o tegumento da soja é composto por três camadas, a epiderme, a hipoderme e o parênquima lacunoso sendo que no estágio R4 as camadas da epiderme e o parênquima lacunoso já se encontram mais definidos (Figura 1) do que a camada da hipoderme.

A partir do estágio R5 as três camadas do tegumento se encontram completamente bem formadas e definidas (Figura 2) não sofrendo alterações no estágio R6 e R7 (Figuras 3 e 4). Comparando-se os tegumentos nos estádios R5 e R6 constata-se que tanto as camadas paliçádicas como as camadas de células em ampulheta sofrem uma diminuição na espessura (Tabela 3 e 4). Segundo Mertz et al. (2009) esse fato pode ser atribuído a compressão dessas camadas provocadas pelo crescimento dos cotilédones.

No estágio R7, em ambas as camadas foram observados novamente aumento na espessura, possivelmente pela diminuição do teor de água das sementes, permitindo a descompressão das camadas do tegumento.

Tabela 3 Espessura ( $\mu\text{m}$ ) das camadas paliçádicas dos estádios R5, R6 e R7

Cultivares	R5	R6	R7
BRS Silvânia RR	48,47 a	40,83 b	46,86 a
BRS Valiosa RR	46,11 a	41,21 b	47,03 a
BRS Celeste	46,96 a	41,78 b	44,85 a
BRS 133	44,16 a	40,54 b	45,40 a
Savana	47,89 a	40,95 a	49,63 a
Doko	48,77 a	43,69 b	51,10 a

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Tabela 4 Espessura ( $\mu\text{m}$ ) das camadas em ampulheta dos estádios R5, R6 e R7

Cultivares	R5	R6	R7
BRS Silvânia RR	35,42 a	27,91 b	32,34 a
BRS Valiosa RR	41,62 a	35,02 b	51,12 a
BRS Celeste	43,58 a	28,52 b	39,89 a
BRS 133	42,13 a	37,55 b	46,89 a
Savana	55,86 a	48,84 b	59,51 a
Doko	65,47 a	34,49 b	70,22 a

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

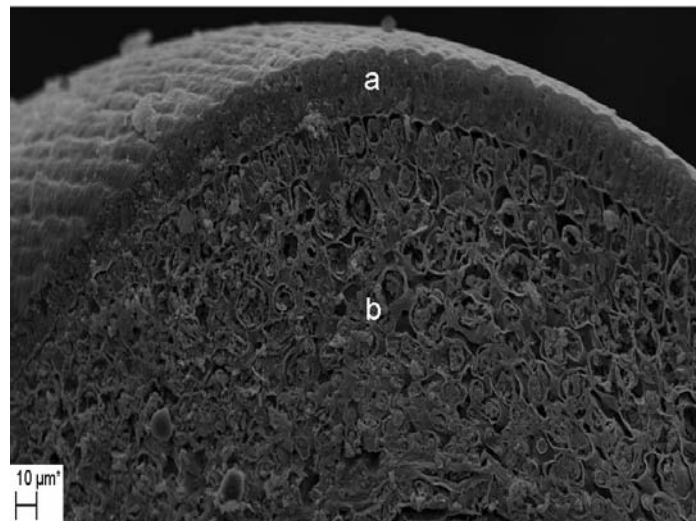


Figura 1 Tegumento de semente de soja no estágio R4, obtida por Microscopia eletrônica de varredura. a: camada de células paliçádicas; b: parênquima lacunoso

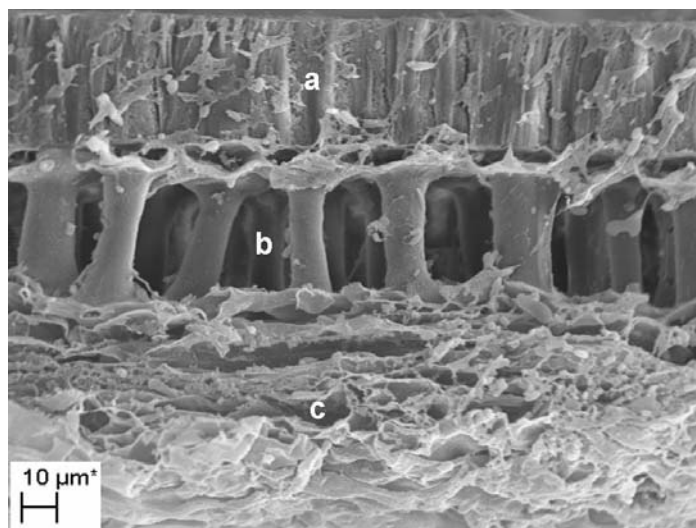


Figura 2 Tegumento de semente de soja no estágio R5, obtida por Microscopia eletrônica de varredura. a: camada de células paliçádicas; b: camada de células em ampulheta e c: parênquima lacunoso

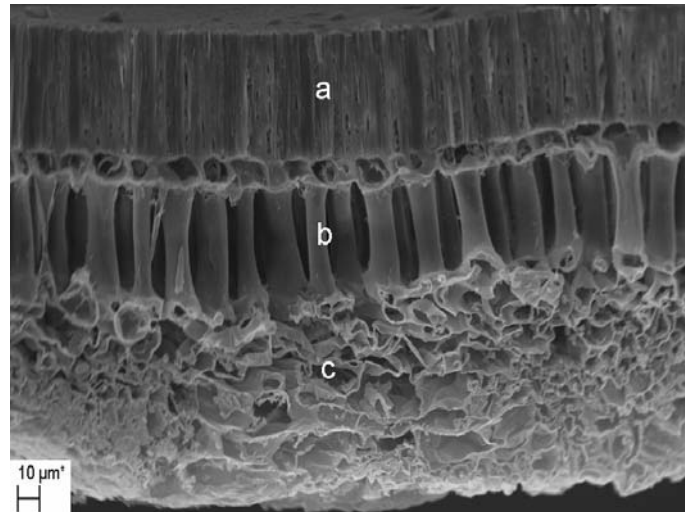


Figura 3 Tegumento de semente de soja no estágio R6, obtida por Microscopia eletrônica de varredura. . a: camada de células paliçádicas; b: camada de células em ampulheta e c: parênquima lacunoso

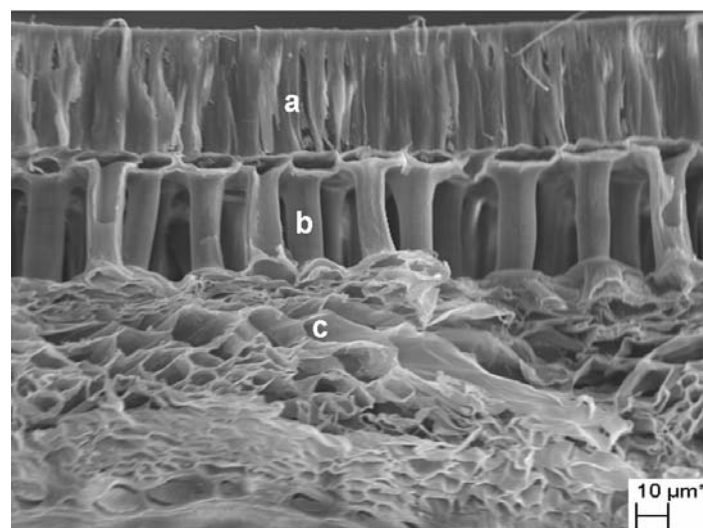


Figura 4 Tegumento de semente de soja no estágio R7, obtida por Microscopia eletrônica de varredura. a: camada de células paliçádicas; b: camada de células em ampulheta e c: parênquima lacunoso

#### **4 CONCLUSÕES**

O tegumento de sementes de soja formado pela epiderme, hipoderme e o parênquima lacunoso se encontra formado e definido a partir do estágio R5.

Há indícios de relação entre a espessura das camadas de células paliádicas e em ampulheta e o vigor de sementes avaliado pelo teste de condutividade elétrica.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: FAEPE, 2004. 43 p. Apostila.
- BARBER, M. S.; RIDE, J. P. A quantitative assay for induced lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors of the response. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 32, n. 2, p. 185-1197, Mar. 1988.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.
- CAVARIANI, C. et al. Velocidade de hidratação em função de características do tegumento de sementes de soja de diferentes cultivares e localidades. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 31-39, 2009.
- Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos safra 2009/2010**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 7 maio 2010.
- DASSOU, S.; KUENEMAN, E. A. Screening methodology for resistance to field weathering in soybean seed. **Crop Science**, Madison, v. 24, n. 4, p. 774-778, 1984.
- ESAÚ, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: E. Blucher, 1976. 293 p.
- FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. Malaysia: Longman, 1996. 464 p.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stage of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 11 p.
- FERREIRA, D. F. **Sisvar**. Versão 4.2. Lavras: Ufla, 2003. Software.
- KASTER, M. et al. Mejoramiento de la calidad fisiologica de la semilla de soja y metodologia de evaluacion. In: Conferencia Mundial de Investigacion em Soja, 4., 1989, Buenos Aires. **Actas...** Buenos Aires: A. J. Pascale, 1989. p. 1106-1111.

MENEZES, M. et al. Aspectos químicos e estruturais da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1716-1723, dez. 2009.

MERTZ, L. M. et al. Diferenças estruturais entre tegumentos de sementes de soja com permeabilidade contrastante. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 23-29, Jan. 2009.

OMETO, J. C. **Bioclimatologia vegetal**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981. 525 p.

PANOBIANCO, M. et al. Electrical conductivity of soybean seed and correlation with seed coat lignin content. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, n. 3, p. 945-949, May 1999.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; VICENTE, V. H. A. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Lavras: UFLA, 1999. 359 p.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SILVA, M. A. D. **Morfologia da testa e potencial fisiológico de sementes de soja**. 2003. 84 p. Tese (Doutorado em Produção e Tecnologia de Sementes) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. de. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164 p.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 4, p. 1-26.

## CAPÍTULO 3

### **Expressão quantitativa relativa (qPCR) de genes envolvidos na via de biossíntese de lignina durante o desenvolvimento de sementes de soja**

#### **RESUMO**

Na literatura são escassos os trabalhos relacionados à expressão gênica de lignina em sementes. O estudo da expressão gênica em plantas tem-se mostrado fundamental, possibilitando o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos em processos biológicos importantes como a identificação de vias bioquímicas ou de sinalização chave, os quais poderão ser usados ou manipulados em programas de melhoramento vislumbrando a produção de sementes de soja com alta qualidade. No presente trabalho foi realizado o estudo da expressão dos genes phenylalanine ammonia-lyase (PAL), cinamato-4Hidroxilase (C4H), 4 hidroxicinamato 3-hidroxilase (C3H) e cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), envolvidos na biossíntese de lignina durante o desenvolvimento de sementes de soja. Foi utilizado como controle endógeno o gene ELFB, em duas repetições biológicas e em triplicatas para cada tratamento. Foram analisados a expressão quantitativa relativa destes genes durante os estádios R4, R5, R6 e R7 de desenvolvimento. Para o estudo da expressão gênica foi utilizada a técnica de PCR em tempo real (qPCR). As análises foram feitas em equipamento ABI PRISM 7500 usando o método do Ct comparativo e o SYBR Green para detecção da amplificação. Como calibrador foi escolhido a amostra de sementes no estágio R4. Ocorre maior expressão dos genes C4H e PAL em sementes de soja nos estádios R5 e R6 de desenvolvimento. O gene CAD se expressa nas fases finais de desenvolvimento das sementes de soja. Em sementes de cultivares de soja com baixos teores de lignina há maior expressão do gene PAL no estágio R7 de desenvolvimento.

Palavras-chave: Expressão gênica. PCR em tempo real. Lignina. Sementes. Soja.



## ABSTRACT

In the literature are scarce the works related to the gene expression of lignin in seeds. The study of the gene expression in plants has proved fundamental, making the understanding of the molecular mechanisms involved in important biological processes such as the identification of biochemical pathways or of key signaling, which will be able to be used or manipulated in improvement programs intending the production of high-quality soybean seeds possible. In the present work, the study of the expression of genes phenylalanine ammonia-lyase (PAL), cinnamate-4Hydroxylase (C4H), 4 hydroxycinnamate 3-hydroxylase (C3H) e cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), involved in the lignin biosynthesis during the development of soybean seeds was conducted. As the endogenous control, gene ELFB was used in two biological replications and in triplicates for each treatment. The relative quantitative expression of these genes during R4, R5, R6 and R7 development stages was analyzed. For the gene expression study, the real time PCR technique (qPCR) was used. The analyses were done in ABI PRISM 7500 equipment using the comparative Ct method and the SYBR Green for detection of amplification. As a calibrator the seed samples at R4stage was chosen. Increased expression of C4H and PAL genes occurs in soybean seeds at development R5 and R6stages. CAD Gene expresses itself at the final development phases of soybean seeds. In low lignin soybean cultivars, there is higher expression of PAL gene at development stage.

Keywords: Gene expression. Real time. Lignin. Seeds. Soybean.

## 1 INTRODUÇÃO

A variabilidade genética entre genótipos de soja para a característica de qualidade fisiológica de sementes tem sido explorada em programas de melhoramento genético.

Dentre os fatores que interferem na qualidade, características do tegumento, principalmente relacionado ao acúmulo de lignina, têm sido exploradas.

Tem-se buscado em programas de melhoramento voltados à produção de sementes de soja com alta qualidade, genótipos com alto teor de lignina por apresentarem maior resistência ao impacto mecânico e impermeabilidade do tegumento (ALVAREZ et al., 1997). O tegumento desempenha um papel vital no ciclo de vida das plantas, controlando o desenvolvimento do embrião e a determinação da dormência das sementes e germinação

O conhecimento em nível molecular de características relacionadas à qualidade de sementes de soja pode possibilitar avanços em processos de seleção nos programas de melhoramento e desenvolvimento de cultivares com alta qualidade.

O estudo da expressão gênica em plantas inclui a quantificação de RNAm sendo expresso sob diferentes condições, como estresses por temperatura, diferentes estádios de desenvolvimento, diferentes células ou tecidos. Uma das técnicas utilizadas para estudos de expressão gênica é a PCR em tempo real (qPCR). No RT-qPCR a quantificação de RNAm é acompanhada pelos métodos de análises absoluta ou relativa. O método de quantificação relativa tem sido usado mais freqüentemente e fornece comparações precisas entre diferentes tratamentos em relação à expressão gênica.

Dentro desse contexto, objetivou-se estudar a expressão quantitativa relativa dos genes phenylalanine ammonia-lyase (PAL), Cinamato-4Hidroxilase

(C4H), 4 Hidroxicinamato 3-Hidroxilase (C3H) e cinamil álcool desidrogenase (CAD) envolvidos na via metabólica da lignina, durante o desenvolvimento de sementes de soja com diferentes teores de lignina.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção das sementes**

O trabalho foi realizado na área experimental e no Laboratório Central de Análises de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Sementes das cultivares com alto teor de lignina BRS Silvânia RR, Doko e com baixo teor de lignina, BRS Celeste e BRS 133 foram produzidas em área com solo classificado como Latossolo Roxo distroférico realizando-se a semeadura sob o sistema de plantio direto.

As sementes foram tratadas com o fungicida Vitavax-Thiran 200 SC na dosagem de 250 ml/100 Kg de sementes para o plantio. Em seguida as sementes foram inoculadas com produto comercial turfoso, objetivando garantir uma população mínima de 1200000 bactérias/semente.

A adubação foi realizada mediante análise de fertilidade do solo, conforme recomendações de Ribeiro, Guimarães e Vicente (1999). A multiplicação das sementes foi realizada em delineamento de blocos casualizados com três repetições. As unidades experimentais constavam de 4 linhas de 5m cada, sendo consideradas apenas as 2 linhas centrais como área útil. O desbaste foi realizado mantendo-se uma população de 16 plantas por metro linear.

Para a realização do estudo da expressão gênica foram colhidas as sementes nos estádios de desenvolvimento: R4(final da formação da vagem), R5(início do desenvolvimento da semente), R6(enchimento do grão) e R7(ponto de maturidade fisiológica) (FHER; CAVINESS, 1977). As sementes foram armazenadas a -80°C até a realização das análises.

Antes do início da manipulação dos tecidos para a extração do RNA, todos os materiais e soluções foram tratados com DEPC 0,1% para inibição das RNase's, enzimas que degradam o RNA.

## **2.2 Extração do RNA**

Para a extração do RNA total sementes em cada estágio de desenvolvimento foram maceradas em nitrogênio líquido usando cadinho e pistilo. O reagente usado foi o PureLink Plant RNA (INVITROGEN) segundo recomendações do fabricante com algumas modificações.

Para 0,1 g de tecido da semente, colocado em um microtubo de 2,0 ml, foram adicionados 500  $\mu$ L de PureLink Plant RNA e agitado em vórtex por 20 seg. e mantido em repouso na posição horizontal por 5 min., para melhor homogeneização do material. Em seguida o material foi centrifugado a 14.000 xg a 4°C durante 15 min. Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para novo microtubo adicionando-se 300  $\mu$ L de clorofórmio, 100  $\mu$ L de cloreto de potássio (5M) seguido de agitação. Novamente foi realizado a centrifugação a 14.000 xg a 4 °C durante 10 min. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo adicionando-se o mesmo volume de álcool isopropílico e o microtubo foi mantido em repouso durante 10 min. Posteriormente o material foi centrifugado a 14.000 xg a 4 °C por 10 min. Em seguida foi descartado o sobrenadante e adicionou-se 1 ml de etanol 70% centrifugando a 14.000 xg em temperatura ambiente durante 1 min. O sobrenadante foi removido e o pellet secado por 10 min, o qual foi ressuspendido em 20  $\mu$ L de água com DEPC 0,1% e armazenado a -80°C.

A quantificação do RNA total extraído foi feita no equipamento Nanovue Plus medindo-se a absorbância a 260 e 280nm, observando a razão de

comprimento de onda 260/280 cujos valores se encontraram na faixa de 1,8 a 2,1, o que indica extração de alta qualidade.

A integridade do RNA também foi analisada por eletroforese em gel de agarose (1,5%) contendo tampão TBE 1x e corado com solução de brometo de etídeo. A corrida aconteceu a 90V durante 30 min.

### **2.3 Tratamento com DNase e síntese do cDNA**

Para evitar possíveis contaminações das amostras com DNA genômico realizou-se o tratamento com DNase I (Ambion) de acordo com recomendações do fabricante. A síntese do cDNA a partir do RNA total foi realizada usando-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Inicialmente, o RNA foi preparado a uma concentração de 1 µg em um volume final de 10 µL. Em seguida foi preparado um mix contendo 2 µL do tampão 10x da enzima, 0,8 µL do mix 25X dNTP, 2µL do primer RT Random Primer 10X, 1 µL de MultScribe Reverse Transcriptase e água para um volume final de 10 µL.

Para cada solução preparada de 10 µL de RNA a 1 µg, foram acrescentados 10 µL desse mix. Após a síntese do cDNA, a reação de PCR convencional foi realizada para verificar a integridade deste em gel de agarose 1,5%.

Os primers utilizados foram desenhados por meio do programa Primer Express 3 (Applied Biosystems) e estão apresentados na Tabela 1. Os genes  $\beta$  actina, CYP2 e ELFB foram escolhidos como controles endógenos por apresentarem expressão constitutiva.

Tabela 1 Primers utilizados na análise de qRT-PCR

Gene	Sequência do Primer
$\beta$ actina F	5' TCCAAGGGGACCTAACGGAGA 3'
$\beta$ actina R	5' TGGGTCAAGAGCTGGATGGTG 3'
CYP2 F	5' CGGGACCAGTGTGCTTCTCA 3'
CYP2 R	5' CCCCTCCACTACAAAGGCTCG 3'
ELFB F	5' GTTGAAAAGCCA GGGGACA 3'
ELFB R	5' TCTTACCCCTTGA GCGTGG 3'
C3H F	5' TCCTGACTATTATTTCCGCATCAC 3'
C3H R	5' TTATCACACATGCGCTTGAATTT 3'
CAD F	5' TGTGCTGCAGTTGCGTACA 3'
CAD R	5' CGGAAAACCAAGTCTCATCAACTA 3'
PAL F	5' AACAACGGCACTGACAGTTACG 3'
PAL R	5' GAGCACCACCCTGTTTGGTT 3'
C4H F	5' CGCACAAGGCGTAGAATTTG 3'
C4H R	5' CCATTCCCCGTGAAGATATCA 3'

(F) sequência do primer forward. (R) sequência do primer reverse

## 2.4 Quantificação relativa

Para a quantificação da expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real, os valores obtidos correspondentes aos níveis de mRNA's das amostras foram comparados relativamente aos valores dos níveis de mRNA's de controle. Após a obtenção dos dados brutos, estes foram analisados por meio do programa 7500 Software SDS (Versão 2.0.1). Para calcular o nível de expressão dos genes de interesse foram considerados: Ct (aumento exponencial do produto de PCR) do gene alvo e controle endógeno,  $\Delta Ct = Ct \text{ (amostra)} - Ct \text{ (controle endógeno)}$  e o  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (amostra)} - \Delta Ct \text{ (calibrador)}$ . Em seguida o nível de expressão foi calculado pela fórmula:  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Por meio do programa calculou-se os valores de  $\Delta Ct$ ,  $\Delta\Delta Ct$ , e  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Para o cálculo do  $\Delta\Delta Ct$  ser válido, as eficiências de amplificação do gene alvo e do gene endógeno devem ser aproximadamente iguais. O calibrador utilizado para as análises foram amostras de sementes no estágio de desenvolvimento R4.

Para o cálculo do  $\Delta C_t$  foi obtido o  $C_t$  que é o ciclo definido como threshold, ou seja onde a fluorescência é detectável e é inversamente proporcional ao logaritmo do número inicial de cópias (TYAGI; BRATU; KRAMER, 1998).

Para determinar a concentração ideal de uma reação de PCR, foi construída uma curva de eficiência com diferentes concentrações de cDNA (1x, 10x, 100x, 1000x, 10000x) para todos os pares de primers utilizados.

Pela curva de eficiência foi determinado o valor da inclinação da reta (*slope*) e a partir deste valor calculou-se a eficiência de amplificação na reação de acordo com a fórmula:  $E = [10^{(-1/slope)}] - 1$ . Ressalta-se que a eficiência tanto do gene alvo quanto do controle endógeno devem ser similares e bem próximo de 100% (TYAGI; BRATU; KRAMER, 1998).

Após definir a diluição 10x as reações de qRT-PCR foram realizadas pelo método do CT comparativo e preparadas em triplicatas para cada uma das duas repetições biológicas. Dos três controles endógenos avaliados optou-se pelo uso do EFLB por se mostrar mais estável.

A reação foi realizada à 50°C por 2 min e seguida por 95 °C por 10 minutos. A ciclagem foi em 40 ciclos com temperaturas de desnaturação de 95 °C por 15 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. Após ter sido realizadas as devidas padronizações, as reações de amplificação foram conduzidas em um volume final da reação de 20  $\mu$ L contendo: 10  $\mu$ L de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2  $\mu$ L de cDNA, 0,4  $\mu$ L de cada um dos primers forward e reverse e 7,2  $\mu$ L de água ultrapura autoclavada. Todas as reações foram realizadas no equipamento ABI PRISM 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems).

Após a amplificação por PCR em tempo real, cada produto da amplificação foi analisado por uma curva de dissociação certificando que, para cada gene e tratamento, o produto amplificado não apresentou bandas inespecíficas e/ou formação de dímeros de primer.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da extração utilizando o reagente PureLink Plant RNA (Invitrogen) foram observados RNA's totais com alta qualidade, íntegros e livres de impurezas (Figura 1). A visualização da viabilidade do cDNA construído a partir da amplificação do gene constitutivo pode ser observado (Figura 2).

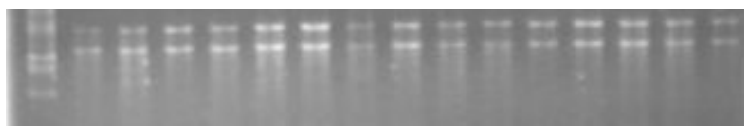


Figura 1 Eletroforese de RNA em gel de agarose 1,5%

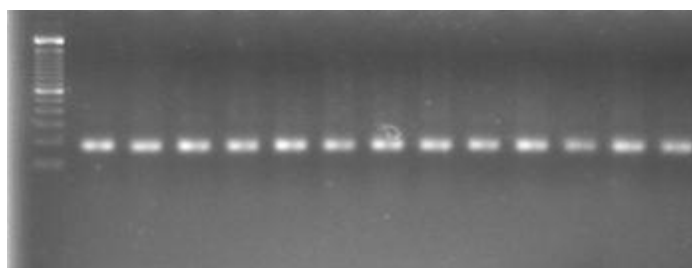


Figura 2 A Síntese do cDNA

Pela Figura 2 pode ser observado, pela curva de dissociação, que após a amplificação por meio da técnica de PCR em tempo real, não foram verificadas bandas inespecíficas e/ou formação de dímero de primer. A curva de dissociação foi realizada para cada tratamento. A apresentada no Gráfico 1 refere-se ao gene PAL.

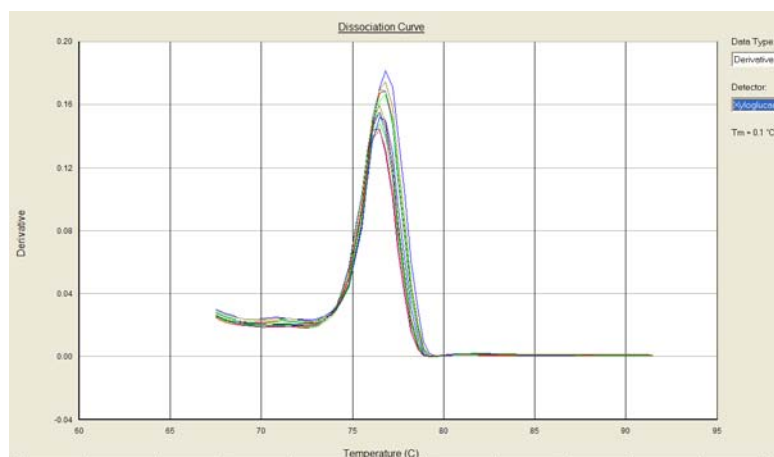


Gráfico 1 Curva de Dissociação ou de Melting

Em sementes no estágio de desenvolvimento R5 tanto nas sementes classificadas como de alto e baixo teor de lignina, foi observada maior expressão do gene C4H. Ressalta-se, no entanto que nas sementes das cultivares BRS Silvânia RR e Doko classificadas como alto teor de lignina, os níveis de expressão desse gene foram superiores aos observados nas sementes das cultivares BRS Celeste e BRS 133 classificadas com baixo teor de lignina.

Também pode ser observada maior expressão desse gene em sementes da cultivar BRS Silvânia RR (6,5) em relação às sementes de Doko (3,75).

Nas cultivares BRS Silvânia RR e Doko, com maiores teores de lignina, em sementes no estágio R6 também há predominância de expressão do gene C4H, em relação aos demais estudados. No entanto, em termos numéricos a expressão foi maior na cultivar Doko (2,0) em relação a observada em sementes da cultivar BRS Silvânia RR (1,0).

Em sementes da cultivar BRS Celeste, classificada como de baixo teor de lignina, há predominância de expressão desse gene também no estágio R6, com RQ( quantificação relativa) correspondendo a 1,5, valor superior ao observado em sementes da cultivar BRS Silvânia RR. Em sementes da cultivar

BRS133 (baixo teor de lignina) no estágio R6, também há expressão do gene C4H, RQ=0,8. No entanto, em sementes neste estágio de desenvolvimento há maior expressão do gene PAL (2,25). Ao comparar esse valor ao observado na expressão desse gene, nas demais cultivares, e no mesmo estágio de desenvolvimento R6, verifica-se maior expressão em sementes da cultivar BRS 133.

Em sementes nos estágios R6 e R7 foi observada maior expressão do gene PAL nas cultivares com baixos teores de lignina em relação à observada em sementes de cultivares com altos teores de lignina. Segundo Zhao, Davis e Verpoorte (2005) a expressão do gene PAL é altamente influenciada pelo ambiente por estar relacionada à proteção de plantas. Isso sugere que possivelmente as sementes dessas cultivares durante o processo de produção possam ter sofrido algum tipo de estresse biótico ou abiótico, aumentando a expressão deste gene.

Com relação ao gene C3H, maior expressão foi observada em sementes da cultivar BRS 133 nos estágios R5 e R6 de desenvolvimento. Para as demais cultivares o nível de expressão foi baixo em todos os estágios de desenvolvimento. O 4-Hidroxicinamato 3-Hidroxilase (C3H) exerce a função de hidroxilação do ácido p-cumárico, depois do cinamato-4-hidroxilase (C4H) (DIXON et al., 2001). Segundo Darley et al., (2001) ambos participam das etapas iniciais no processo de formação dos precursores de lignina.

Em todas as cultivares estudadas foi observado a maior expressão do gene CAD em sementes no estágio R7 de desenvolvimento, em relação à observada nos estágios R5 e R6. No entanto, menor expressão foi observada nos estágios R5 e R6. O gene CAD está envolvido na última etapa de biossíntese dos monolignóis, e por ter alta especificidade é considerada como marcador do processo de lignificação (KIEDROWSKI et al., 1992).

Assim presumi-se que a expressão desse gene seja importante nos estádios finais de desenvolvimento da semente, próximo ao ponto de maturidade fisiológica das sementes.

De uma maneira geral foi observada maior expressão dos genes C4H e PAL em sementes nos estádios R5 e R6 de desenvolvimento. Esses genes estão envolvidos nas etapas iniciais do processo de biossíntese de lignina. Tanto a PAL como a C4H atuam na formação dos precursores da lignina (RAES et al.; 2003).

Deve ser considerado ainda que apesar de os estádios de desenvolvimento em sementes de soja estarem bem definidos, em uma mesma planta há sementes em diferentes estádios de desenvolvimento. Assim no momento da colheita pode ocorrer a amostragem de sementes com diferentes níveis de desenvolvimento. Nessa condição pode ocorrer variações na expressão de genes envolvidos na síntese de lignina. Também os genes podem ou não ser expressos em função de estresses bióticos e abióticos que podem ocorrer durante o desenvolvimento de sementes.

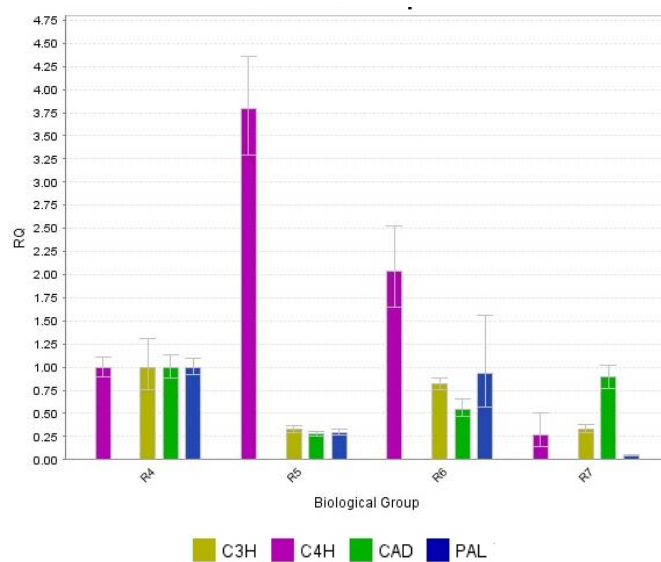


Gráfico 2 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes C3H, C4H, CAD e PAL durante os estádios de desenvolvimento de sementes de soja. Cultivar Doko (alto teor de lignina)

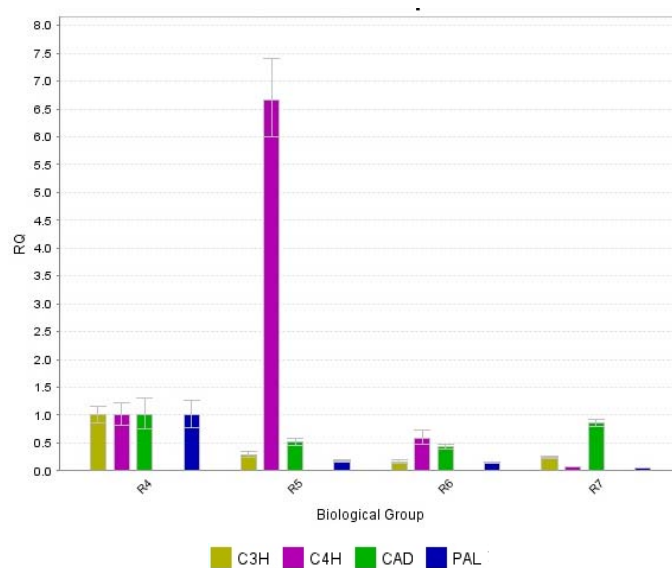


Gráfico 3 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes C3H, C4H, CAD e PAL durante os estádios de desenvolvimento de sementes de soja. Cultivar BRS Silvânia RR (alto teor de lignina)

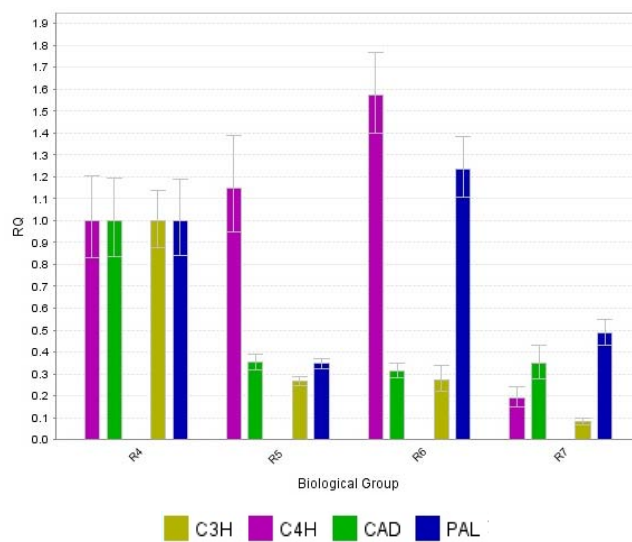


Gráfico 4 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes C3H, C4H, CAD e PAL durante os estádios de desenvolvimento de sementes de soja. Cultivar BRS Celeste (baixo teor de lignina)

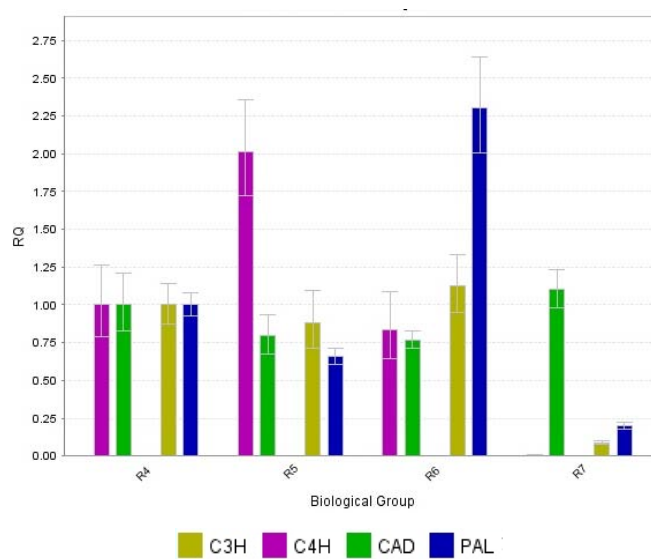


Gráfico 5 Perfil da expressão quantitativa relativa dos genes C3H, C4H, CAD e PAL durante os estádios de desenvolvimento de sementes de soja. Cultivar BRS 133 (baixo teor de lignina)

#### **4 CONCLUSÕES**

Ocorre maior expressão dos genes cinamate-4-hydroxylase (C4H) e phenylalanine ammonia-lyase (PAL) em sementes de soja nos estádios R5 e R6 de desenvolvimento.

O gene cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) se expressa nas fases finais de desenvolvimento das sementes de soja.

Em sementes de cultivares de soja com baixos teores de lignina há maior expressão do gene phenylalanine ammonia-lyase (PAL) no estádio R6 e R7 de desenvolvimento.

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, P. J. C. et al. Relationship between soybean seed coat lignin content and resistance to mechanical damage. **Seed Science and Tecnology**, Zurich, v. 25, n. 2, p. 209-214, Apr. 1997.
- DARLEY, C. P. et al. The molecular basis of plant cell wall extension. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, n. 1/2, p. 179-195, Sept. 2001.
- DIXON, R. A. et al. The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid”, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, n. 7, p. 1069-1084, Aug. 2001.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stage of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 11 p.
- KIEDROWSKI, S. et al. Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly depended on the Arabidopsis RPMJ disease resistance locus. **EMBO Journal**, Oxford, v. 11, n. 13, p. 4677-4684, Dec. 1992.
- RAES, J. et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in arabidopsis. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, n. 3, p. 1051-1071, Mar. 2003.
- RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; VICENTE, V. H. A. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Lavras: UFLA, 1999. 359 p.
- TYAGI, S.; BRATU, D. P.; KRAMER, F. R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. **Nature Biotechnology**, New York, v. 16, n. 1, p. 49-53, Jan. 1998.
- ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advance**, New York, v. 23, n. 4, p. 283-333, June 2005.