

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



DISSERTAÇÃO

**Caracterização morfo-fisiológica e identificação de fragmentos de cDNA
diferencialmente expressos em tegumentos de sementes de soja com
permeabilidade contrastante**

Liliane Marcia Mertz

Pelotas, 2007

LILIANE MARCIA MERTZ

**Caracterização morfo-fisiológica e identificação de fragmentos de cDNA
diferencialmente expressos de tegumentos de sementes de soja com
permeabilidade contrastante**

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

Orientador: Paulo Dejalma Zimmer

Pelotas, 2007

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744

M575c Mertz, Liliane Marcia

Caracterização morfo-fisiológica e identificação de fragmentos de cDNA diferencialmente expressos de tegumentos de sementes de soja com permeabilidade contrastante / Liliane Marcia Mertz Pelotas, 2007. 44f. :il.

Dissertação (Mestrado) .–Programa de Pós-Graduação em Sementes. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2007, Paulo Dejalma Zimmer, Orientador.

1. Glycine max 2. Tegumento preto 3. cDNA-AFLP I Zimmer, Paulo Dejalma (orientador) II .Título.

Banca Examinadora:

Prof. Paulo Dejalma Zimmer Dr.

Prof. Francisco Amaral Villela Dr.

Prof. Beatriz Helena Gomes Rocha Dr.

Cláudia Roberta Damiani Ph.D

Ao meu pai (*in memoriam*)

A toda minha família

Ao meu namorado Fernando

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus acima de tudo.

Ao Fernando meu namorado, amigo, companheiro de trabalho, que sempre esteve ao meu lado, me dando amor e apoio. Você, mais do que ninguém, compartilhou comigo cada conquista, cada obstáculo a ser vencido e principalmente me deu força para continuar mesmo quando isso parecia impossível. A você a minha mais profunda e sincera gratidão.

Aos meus pais por todo amor, apoio, incentivo e por todos os sacrifícios que fizeram pra que eu pudesse estar aqui hoje.

Às minhas irmãs, meus cunhados e meus sobrinhos, com quem sempre encontrei amor e apoio, por terem me acompanhado ao longo de toda essa caminhada.

Ao Ademar, Sueli e Mario Henning, aonde encontrei uma segunda família, que me deu além de muitas alegrias, amor e dedicação.

Ao Doutor Ademir Henning, pelo incentivo e auxílio prestados, desde meu ingresso até a conclusão do Mestrado.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Sementes, em especial ao meu orientador e amigo Professor Paulo Dejalma Zimmer, pela amizade e pelos valiosos ensinamentos durante o curso.

Ao professor Odir Dellagostin, por todos os conhecimentos que me foram transmitidos.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia Ireni, Alice, Silvio, Juliana e Bandeira pela amizade e convivência.

À CAPES e a FAPERGS, pela concessão da bolsa de estudos e pelos recursos financeiros.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Sementes em especial aos amigos Marcus, Fabrício e Cibebe.

Aos colegas do laboratório de BioSementes Geri, Gaspar, Fernanda, Patrícia, Guilherme e Hellen pela amizade e convivência.

A todos que de alguma forma contribuíram para concretização deste trabalho.

**Caracterização morfo-fisiológica e identificação de fragmentos de cDNA
diferencialmente expressos em tegumentos de sementes de soja com
permeabilidade contrastante**

Autora: Liliane Marcia Mertz

Orientador: Paulo Dejalma Zimmer

RESUMO

Alguns trabalhos têm evidenciado a existência de genótipos de soja contrastantes para qualidade fisiológica de semente. Tais diferenças podem existir em virtude da presença de sementes com total ou parcial impermeabilidade à penetração de água no tegumento, o que as tornam menos susceptíveis aos danos mecânicos, as adversidades climáticas e a deterioração por umidade. A característica de tegumento semi-permeável pode ser utilizada nos programas de melhoramento de soja para ser incorporada às cultivares de alta produção visando à qualidade fisiológica da semente. Diante do exposto, os objetivos desse estudo foram: identificar diferenças estruturais entre os tegumentos de sementes de soja dos genótipos CD-202 (tegumento permeável) e TP (tegumento semi-permeável); obter fragmentos de genes diferencialmente expressos entre os tegumentos dos dois genótipos; avaliar a qualidade fisiológica das sementes produzidas. A caracterização morfológica dos tegumentos foi realizada através de avaliações em microscópio ótico BX 51 com aumento de 40x. Para obtenção dos fragmentos de genes diferencialmente expressos entre os tegumentos dos dois genótipos, utilizou-se a técnica cDNA – AFLP. A avaliação da qualidade fisiológica das sementes foi através dos testes de germinação e vigor (condutividade elétrica e envelhecimento acelerado). Na avaliação morfológica, foram observadas diferenças estruturais entre os tegumentos de semente dos dois genótipos, sendo que, os tegumentos do genótipo TP, apresentaram maior espessura nas camadas da epiderme e

hipoderme, além de outras diferenças no formato e organização das células. Com relação aos estudos genéticos moleculares, foram identificados 47 fragmentos de genes diferencialmente expressos entre os tegumentos dos dois genótipos. Na avaliação da qualidade fisiológica das sementes, o genótipo TP apresentou qualidade fisiológica superior em relação ao genótipo CD-202.

Palavras chave: *Glycine max*, tegumento preto, genes, cDNA – AFLP.

Morpho-physiologic characterization and identification of fragments of cDNA distinguishing expressed in soybean seed coat with contrasting permeability

Author: Liliane Marcia Mertz

Adviser: Paulo Dejalma Zimmer

SUMMARY

Some works have reported the existence of contrasting soybean genotypes for physiological quality of seeds. There are such differences because of the presence of seeds with total or partial impermeability for water absorption into the coat that make them less susceptible to mechanical damages, weather adversities, deterioration by humidity and pathogen occurrence. The characteristic of semi-permeable coat can be used in programs of soybean crop breeding to be incorporated in genotypes of high production, aiming at the physiologic quality of the seed. The objectives of this study were: Identify structural differences among the coat of the genotypes CD-202 (permeable) and TP (semi-permeable); obtain fragments of genes distinguishingly expressed among the coat of those genotypes; characterize the physiological quality of soybean seeds produced. Morphologic characterization of the coats was carried out by optic microscope BX 51 with increase of 40x. In order to obtain the fragments of genes distinguishingly expressed among the coats of the two genotypes, the technique cDNA – AFLP was used. The physiological quality of the seeds was obtained by germination tests and vigour (accelerated ageing and electrical conductivity). Besides, structural differences were observed among the coats of the two genotypes, however, the genotype TP presented higher thickness in the layers of the epidermis and hypodermis of the coat in relation to the genotype CD – 202, beside differences in the format and organization of the cells. Regarding the molecular genetic studies, 47 fragments distinguishingly expressed in the coats in the formation of genotypes CD - 202 and TP, were identified. In agreement with the

results, soybean seeds with semi-permeable coat presented better physiological quality in relation to the seeds with permeable coat.

Key words: *Glycine max*, black coat, genes, cDNA – AFLP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Tegumento de soja do genótipo TP, coletado 25 dias após a antese em corte transversal com ultramicrotomo, corado com azul de metileno e bórax 1%, e visualizado em microscópio ótico com aumento de 40x. Pelotas, UFPel – 2007.....	31
Figura 2	Tegumento de soja do genótipo CD-202, coletado 25 dias após a antese em corte transversal com ultramicrotomo, corado com azul de metileno e bórax 1%, e visualizado em microscópio, com aumento de 40x. Pelotas, UFPel – 2007.....	32
Figura 3	Tegumento de soja do genótipo TP, coletado 40 dias após a antese em corte transversal com ultramicrotomo, corado com azul de metileno e bórax 1%, e visualizado em microscópio ótico com aumento de 40x. Pelotas, UFPel – 2007.....	32
Figura 4	Tegumento de soja do genótipo CD – 202, coletado 40 dias após a antese em corte transversal com ultramicrotomo, corado com azul de metileno e bórax 1%, e visualizado em microscópio ótico, com aumento de 40x. Pelotas, UFPel –2007	33
Figura 5	Tegumento de soja do genótipo TP, coletado 55 dias após a antese em corte transversal com ultramicrotomo, corado com azul de metileno e bórax 1%, e visualizado em microscópio ótico, com aumento de 40x Pelotas, UFPel – 2007.....	33
Figura 6	Tegumento de soja do genótipo CD – 202, coletado 55 dias após a antese em corte transversal com ultramicrotomo, corado com azul de metileno e bórax 1%, e visualizado em microscópio ótico com aumento de 40x. Pelotas, UFPel –2007.	34

Figura 7	Coloração do tegumento de sementes de soja do genótipo TP em diferentes fases de desenvolvimento. Pelotas – UFPel, 2007.....	34
Figura 8 –	Coloração do tegumento de sementes de soja do genótipo CD - 202 em diferentes fases de desenvolvimento. Pelotas – UFPel, 2007.....	35
Figura 9	RNA total em gel de agarose 1,5%, extraído de tegumentos de soja dos genótipos CD-202 e TP utilizando diferentes protocolos de extração. Fig.8a – Protocolo utilizando o reagente <i>Trizol</i> . Fig.8b – Protocolo estabelecido por Chang et al. (1993). Fig.8c – Protocolo utilizando o reagente <i>Plant RNA</i> . Pelotas, UFPel – 2007.....	36
Figura 10	Separação de fragmentos de cDNA-AFLP dos genótipos CD-202 e TP em gel de poliacrilamida 5%, corado com Nitrato de Prata. Os fragmentos foram obtidos através da técnica de cDNA-AFLP utilizando as combinações de <i>primers</i> : 1- <i>M-CTC/E-AAG</i> ; 2- <i>M-CTT/E-ACA</i> . As setas indicam fragmentos identificados e coletados. Pelotas, UFPel - 2007.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Combinações de <i>primers</i> utilizados nas reações de amplificação seletiva na técnica de cDNA-AFLP.....	23
Tabela 2	Programação do termociclador utilizada na reação de amplificação seletiva na técnica de cDNA-AFLP.....	24
Tabela 3	Qualidade Fisiológica de sementes de soja dos genótipos CD – 202 e TP (Tegumento Preto), produzidas em casa de vegetação, no ano agrícola 2005/06, município de Pelotas- RS	28

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
SUMMARY.....	iiix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 A Cultura da Soja	4
2.2 Tegumento da semente de soja - anatomia e funções.....	5
2.3 Características do tegumento e a qualidade de sementes.....	6
2.4 Marcadores moleculares.....	7
2.4.1 Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP)	9
2.4.2 Amplificação Aleatória do Polimorfismo de DNA (RAPD).....	10
2.4.3 Polimorfismo de <i>locus</i> de seqüências simples repetidas ou Microsatélite (SSR).....	11
2.4.4 Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP)..	12
2.4.5 cDNA-AFLP.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Locais de execução do trabalho.....	15
3.2 Obtenção do material vegetal.....	15
3.3 Coleta das sementes	16
3.4 Avaliação da qualidade fisiológica das sementes.....	16
3.4.1 Teste de Germinação.....	16
3.4.2 Teste de Condutividade elétrica.....	17
3.4.3 Teste de Envelhecimento acelerado.....	17
3.4.4 Análise estatística.....	17
3.5 Caracterização estrutural dos tegumentos.....	17

3.6	Obtenção dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos e avaliação do polimorfismo genético pela técnica de cDNA-AFLP...	18
3.6.1	Extração do RNA total.....	18
3.6.1.1	Protocolo utilizando <i>Trizol</i>	19
3.6.1.2	Protocolo de Chang et al. (1993) modificado.....	19
3.6.1.3	Protocolo utilizando <i>Plant RNA Reagent</i>	20
3.6.2	Obtenção do cDNA dupla fita.....	20
3.6.2.1	Síntese da primeira fita do cDNA.....	20
3.6.2.2	Síntese da segunda fita do cDNA.....	21
3.6.3	cDNA-AFLP.....	22
3.6.3.1	Reação de digestão do cDNA.....	22
3.6.3.2	Ligação de adaptadores.....	22
3.6.3.3	Pré-amplificação.....	23
3.6.3.4	Amplificação seletiva.....	23
3.6.4	Deteção dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos.....	24
3.6.4.1	Preparo e montagem das placas.....	25
3.6.4.2	Preparo da solução do gel de poliacrilamida (5%).....	25
3.6.4.3	Revelação do gel com Nitrato de Prata (BLEIDER, 1982 – modificado).....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1	Qualidade Fisiológica das Sementes.....	27
4.2	Caracterização estrutural dos tegumentos.....	28
4.3	Obtenção dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos pela técnica de cDNA-AFLP.....	35
4.3.1	Avaliação de protocolos de extração do RNA total.....	35
4.3.2	Seleção dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos.....	37
5	CONCLUSÕES.....	40
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja representa mais de 45% do total de grãos produzido no Brasil, com uma produção que ultrapassa 55 milhões de toneladas, demonstrando a importância econômica deste produto para o país (CONAB, 2006).

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

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

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

Em trabalho realizado por Carraro & Peske (2005), constatou-se que 95% dos lotes de sementes produzidos no estado do Paraná possuíam entre 2 e 20% de suas sementes com tegumento danificado e que pelo menos metade das sementes apresentavam-se com mais de 10% desse dano. Além disso, verificou-se que acima de 15% dos lotes apresentavam danos por umidade, significando que as sementes permaneceram por muito tempo no campo, expostas a chuva, orvalho e outras adversidades, o que contribuiu para redução na qualidade fisiológica das mesmas.

A exposição das sementes de soja a ciclos alternados de elevada e baixa umidades antes da colheita, devido à ocorrência de chuvas freqüentes, orvalho ou às flutuações diárias da umidade relativa do ar, resulta na deterioração por umidade a qual, pode ser apontada como a principal causa para a sua baixa qualidade.

Aliado à adversidade climática, a ocorrência de fungos de sementes, em especial *Phomopsis* spp., é outro fator que contribui para acentuar a redução da qualidade das mesmas (HENNING, 2005).

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

Alguns trabalhos têm evidenciado a existência de genótipos contrastantes para qualidade fisiológica da semente (VIEIRA et al., 1987). Tais diferenças podem existir em virtude da presença de sementes duras, as quais apresentam total ou parcial impermeabilidade à penetração de água no tegumento e, conseqüentemente, tornam-se menos susceptíveis aos danos mecânicos, as adversidades climáticas, a deterioração por umidade e a ocorrência de patógenos.

A impermeabilidade total ou parcial de sementes de soja à penetração de água é uma característica que pode ser usada, para produzir genótipos de soja com maior tolerância às adversidades climáticas, presentes após a maturidade fisiológica das sementes.

Nesse contexto, a biologia molecular é uma alternativa para identificação de genes envolvidos nas respostas fisiológicas das sementes. O conhecimento sobre o controle genético de características de importância econômica possibilita a complementação dos métodos tradicionais de melhoramento, visando ganhos genéticos adicionais. O desenvolvimento de pesquisas com enfoque genético molecular, utilizando genótipos de soja com contraste fenotípico para características do tegumento, possibilita ainda, a identificação de genes relacionados, sua clonagem e caracterização.

A partir dos genes identificados é possível maior rapidez e eficiência no desenvolvimento de variedades mais produtivas e de qualidade superior.

As respostas biológicas são controladas pela regulação precisa da expressão gênica, ou seja, é através dela que as diferentes características são expressas em um organismo, sendo necessário o estudo de seus padrões para o entendimento dos diferentes processos. A grande maioria das células de um organismo contém os mesmos genes, entretanto, dependendo do tecido, do estágio de desenvolvimento ou ainda, das condições de ambiente que esse organismo se encontra, esses genes poderão estar sendo expressos ou não.

A técnica de cDNA-AFLP (Polimorfismo do comprimento de fragmentos de cDNA amplificados) é extremamente eficiente para o isolamento de genes diferencialmente expressos, o qual fornece resultados reproduzíveis que foram confirmados em vários estudos (HABU et al., 1997; MAO et al., 2004). Uma população de cDNAs de um determinado tecido representa o conjunto de RNAs presentes neste mesmo local e estágio de desenvolvimento, ou seja, constituem o grupo de genes responsáveis pela expressão das características deste tecido.

Considerando a demanda por pesquisas com enfoque genético-molecular de características relacionadas à fisiologia de sementes, realizou-se esse estudo com os seguintes objetivos:

- 1 - Identificar através de estudos com microscopia eletrônica, diferenças estruturais entre os tegumentos dos genótipos CD-202 (amarelo, permeável e susceptível a deterioração) e TP (preto, semi-permeável e resistente a deterioração).
- 2 - Obter fragmentos de cDNA diferencialmente expressos, entre os tegumentos desses dos genótipos.
- 3 – Avaliar a qualidade fisiológica de sementes de soja produzidas por esses genótipos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – A Cultura da Soja

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

A soja pertence à classe *Dicotyledoneae*, família *Fabaceae*, subfamília *Papilionaceae*, gênero *Glycine*, subgênero *Soja* e espécie *Glycine max* (L.) Merrill. Essa espécie possui número de cromossomos diplóide 40. O germoplasma da soja contém grande número de tipos de plantas, bem como, ampla forma de resistência a pragas e caracteres morfológicos e fisiológicos distintos (GAZZONI, 1994).

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

A evolução inicial da soja no Brasil foi fortemente amparada pelo desenvolvimento de tecnologias que possibilitaram o aumento da área de cultivo. No entanto, com a estabilização da área de cultivo, verificou-se um aumento significativo na produtividade, devido à utilização de novas tecnologias e ao

desenvolvimento de cultivares adaptadas às diversas regiões produtoras (ROESSING et al., 2000).

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

A qualidade das sementes pode ser afetada por diversos fatores durante todo o processo de produção, iniciando pelos fatores genéticos; diferentes variedades de uma mesma espécie podem apresentar maior ou menor vigor e longevidade. As adversidades ocorridas no desenvolvimento das sementes e após a maturidade fisiológica, expõem as sementes ao ataque de pragas e microorganismos, além disso, os processos de colheita, beneficiamento e armazenamento, também têm se revelado como os principais fatores na redução da qualidade das sementes. Todos estes problemas que comprometem a qualidade fisiológica das sementes podem ser relacionados, de uma forma ou de outra, às características do tegumento das sementes (SOUZA & MARCOS-FILHO, 2001).

2.2 – Tegumento da semente de soja - anatomia e funções

O tegumento da semente de soja é a camada externa da semente, originado a partir dos integumentos do óvulo (NEDEL, 2003).

Na soja, as cores do tegumento podem ser amarela, marrom (tonalidade clara ou escura), preta e preta imperfeita. Estudos utilizando microscopia eletrônica demonstraram que a estrutura básica do tegumento compreende quatro camadas: cutícula, epiderme, hipoderme e parênquima (SWANSON et al., 1985).

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

A epiderme é formada por células paliçádicas, as quais formam uma camada contínua envolvendo a semente com exceção do hilo, onde aparece uma segunda camada paliçádica proveniente do funículo. A camada paliçádica é constituída de células esclerenquimatosas, chamadas macroesclerídeos. Essas células são

alongadas perpendicularmente à superfície do tegumento, possuindo paredes celulares espessas e perfuradas na porção superior (PESKE & PEREIRA, 1983).

Abaixo da epiderme encontra-se a hipoderme, camada unicelular formada por osteoesclerídeos, células esclerenquimatosas com parede celular de espessura desuniforme, constituindo uma camada de suporte com considerável espaço intercelular. Essas células não são observadas no hilo, entretanto, os osteoesclerídeos adjacentes ao hilo são maiores que nas áreas mais distanciadas causando uma variação na espessura da camada de 30 a 70 microns (PESKE & PEREIRA, 1983).

Além dessas estruturas, estudos comprovaram a existência de depósitos em forma de material granular localizados na superfície do tegumento. Foram encontradas evidências, que levam a concluir que esses depósitos são compostos por material hidrofílico. Removendo-se esses compostos, foi possível ainda, observar a presença de poros na superfície do tegumento, os quais se apresentavam nas formas circular e alongada (MA et al.; 2004).

As principais funções do tegumento são: proteção do embrião contra danificações mecânicas e ataque de microorganismos, regulação da troca de gases entre o embrião e o ambiente externo e, em muitas espécies, participação no processo de dispersão das sementes. Outra importante função do tegumento é a regulação do intercâmbio de água. Em muitas famílias de plantas, o tegumento da semente atua como regulador da absorção de água (CARVALHO & NACAGAWA, 1988).

2.3 – Características do tegumento e a qualidade de sementes

Entre os genótipos de soja existe variabilidade genética quanto à qualidade fisiológica de sementes, a qual pode ser utilizada em programas de melhoramento genético. Um exemplo é a diferença quanto à resistência ao dano mecânico e a existência de métodos capazes de provocar e avaliar tais danos. Maior tolerância aos danos mecânicos tem sido relacionada ao maior teor de lignina no tegumento da semente de soja, enquanto a resistência à deterioração no campo tem sido relacionada ao grau de permeabilidade do tegumento (ALVAREZ et al., 1997).

Segundo França Neto & Potts (1979), a inclusão das características de tegumento presentes nas sementes semi-permeáveis, em cultivares modernas e de

boas características agronômicas, pode reduzir os índices de deterioração no campo, além de outras vantagens como aumento no potencial de armazenamento da semente, menores infestações de microorganismos e, possivelmente, menores níveis de danos causados pela trilha mecânica.

A semi-permeabilidade do tegumento reduz o efeito das flutuações de umidade sobre as sementes, tornando-as menos suscetíveis à deterioração a campo. Além disso, propicia maior potencial de armazenamento, maior resistência aos danos mecânicos durante a colheita, menor índice de ocorrência de danos causados por percevejos, e maior tolerância à deterioração a campo, mesmo em condições extremas de estresse (FRANÇA NETO et al., 2000).

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

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

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

2.4 – Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são biomoléculas que podem ser relacionadas com uma característica genética fenotípica. As biomoléculas consideradas marcadores moleculares podem ser proteínas (antígenos ou isoenzimas) ou DNA (MALONE & ZIMMER, 2005).

Até meados da década de 1960, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral, fenotípicos e de fácil identificação visual, como nanismo, cor

de pétala ou morfologia foliar. Marcadores morfológicos contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para construção das primeiras versões de mapas genéticos. Entretanto, o pequeno número de marcadores morfológicos distintos em uma mesma linhagem reduzia a probabilidade de se encontrar associações significativas entre estes marcadores e caracteres de importância econômica (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

São muitas as aplicações dos marcadores moleculares em plantas, sendo principalmente utilizados em análises de diversidade genética, na caracterização de germoplasma, no mapeamento de genes e QTLs (Locos de características quantitativas) de interesse e na implantação da SAMM (Seleção Assistida por Marcadores Moleculares).

Pelo fato dos marcadores moleculares discriminarem a contribuição genética de cada genitor na sua descendência, podem ser utilizados para o controle da pureza genética de híbridos ou de linhagens, tornando-se uma importante ferramenta na certificação ou fiscalização de sementes. Outra grande aplicação dos marcadores moleculares é na caracterização de variedades, linhagens ou híbridos (*fingerprintings*), o que tem sido de grande importância na proteção do direito intelectual do melhorista, sendo utilizada como prova legal em processos jurídicos nos países em que vigoram as leis de proteção de cultivares (GUIMARÃES & MOREIRA, 1999).

A área de maior impacto dos marcadores moleculares no melhoramento vegetal é através do emprego da SAMM para identificação de genótipos superiores em populações segregantes. O uso de marcadores moleculares na seleção de genótipos superiores poderá incrementar a eficiência do melhoramento de plantas, pois menor número de progênies por combinação será necessário, bem como, menor número de gerações para a estabilização dos genótipos (FEDERIZZI, 1998).

Com o advento das técnicas de biologia molecular, surgiram metodologias alternativas para detectar polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA. As enzimas de restrição foram empregadas para detectar polimorfismo de fragmentos de restrição pela primeira vez em 1974. Mais tarde, essa estratégia seria combinada com técnicas de hibridizações para criar a técnica de RFLP (Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição). Um salto extraordinário foi dado em 1987 com o desenvolvimento da metodologia *in vitro* para sintetizar moléculas de DNA a partir de um molde. Esta metodologia é conhecida como Reação em Cadeia da

Polimerase, que vem do inglês *Polymerase Chain Reaction* – PCR. A partir desse evento surgiu uma série de novas técnicas de marcadores moleculares, todas utilizando PCR. Atualmente, as técnicas mais empregadas nos programas de melhoramento e que utilizam a PCR são: a técnica de microssatélite ou SSR (Seqüências simples repetidas); a técnica de RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) e a técnica AFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) (MALONE & ZIMMER, 2005).

2.4.1 - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP)

A técnica baseia-se na digestão do DNA genômico com a utilização de diferentes enzimas de restrição (duas ou mais). A restrição produz quantidades equimolares de fragmentos para uma determinada molécula de DNA. Os fragmentos resultantes da digestão com enzimas de restrição são separados por eletroforese em géis de agarose corado com brometo de etídeo e transferidos por capilaridade para uma membrana de nylon ou nitrocelulose através da metodologia *Southern blot*. Posteriormente esta membrana é hibridizada com sondas de DNA marcadas radioativamente (sondas quentes) ou marcadas fluorescentemente (sondas frias). As sondas RFLP podem variar de 500 a 1000 pb. O produto da hibridização é visualizado mediante auto-radiografia, neste caso a radiação emitida pela marcação da sonda sensibiliza o filme fotográfico apenas no local onde a sonda hibridizou com o DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

O polimorfismo gerado por RFLP deve-se a rearranjos no DNA ocasionados principalmente por perdas, inserções ou substituições de seqüências ou nucleotídeos individuais que ocasionam perdas ou surgimentos de sítios de reconhecimento das enzimas de restrição. O polimorfismo é detectado através das diferenças no peso molecular dos fragmentos homólogos de restrição do DNA genômico, quando hibridizado com uma sonda especificamente selecionada. A expressão destes marcadores é de natureza codominante, devido a esta característica, todas as formas alélicas de um gene são distinguíveis no padrão de bandas, permitindo detectar os locos heterozigotos ou estudar o fluxo gênico entre diferentes populações (MALONE & ZIMMER, 2005).

Entre as principais vantagens dos marcadores RFLP, pode-se destacar: a existência de um elevado número deles distribuídos pelo genoma; a inexistência de efeito do ambiente; a ausência de efeitos pleiotrópicos; e, podem ser avaliados em qualquer estágio do desenvolvimento da planta. A aplicação desta técnica é de grande utilidade em estudos filogenéticos, diversidade genética e identificação de constituições genéticas com propósitos de proteção de cultivares.

Entre as principais desvantagens da técnica RFLP pode-se destacar: a necessidade de clonagem de sondas, a detecção de polimorfismo em filmes fotográficos e, em muitos casos, o uso da radioatividade. São tarefas laboriosas, demoradas e com custo elevado, embora nos últimos tempos, o desenvolvimento da técnica não-radioativa (utilização de sondas frias marcadas fluorescentemente) tenha simplificado notavelmente o procedimento.

2.4.2 - Amplificação Aleatória do Polimorfismo de DNA (RAPD)

Essa técnica foi desenvolvida concomitantemente por dois grupos nos Estados Unidos (Welsh & McClelland, 1990; Williams, 1990). A técnica de RAPD utiliza *primers* aleatórios de 10 nucleotídeos que são utilizados para amplificar regiões genômicas ao acaso (aleatoriamente). O produto da amplificação é separado em géis de agarose. As bandas geradas, de diferentes pesos moleculares, representam diferentes *loci* dentro do genoma. A técnica permite a utilização de dois ou mais *primers* dentro da mesma reação, permitindo assim, aumentar o número de bandas e obter maior quantidade de informação em cada reação (WILLIAMS et al., 1990).

A técnica RAPD pode detectar regiões de DNA altamente variáveis (5-10 *loci* por *primer*) e, embora venha sendo substituída por técnicas mais estáveis, ainda é muito utilizada. Foi a primeira técnica de marcadores moleculares, baseada em PCR, empregada para estudos de mapeamento gênico, identificação de raças, estudos de hibridização inter e intra-específica e em estudos de variação gênica entre populações aparentadas (MALONE & ZIMMER, 2005).

Os marcadores RAPD se comportam como marcadores genéticos dominantes, ou seja, ao se observar uma banda RAPD no gel não é possível distinguir se aquele segmento se originou a partir de uma ou de duas cópias da sequência amplificada, se é homozigoto dominante ou heterozigoto.

A rapidez na obtenção dos resultados, o baixo custo, a não utilização de radioatividade (a visualização do DNA é feita utilizando coloração com brometo de etídio), baixo investimento em equipamentos e, uma quantidade mínima de DNA é requerida para a análise são as principais vantagens do RAPD.

2.4.3 - Polimorfismo de *locus* de seqüências simples repetidas ou Microssatélite (SSR)

Os microssatélites constituem-se de seqüências de um a cinco nucleotídeos repetidos em *tandem* e se apresentam de forma abundante, principalmente nas plantas. Mediante a análise do polimorfismo dos microssatélites é possível avaliar a dissimilaridade genética entre diferentes genótipos, amplificando, via PCR, a região genômica que corresponde às seqüências repetitivas. A amplificação é feita utilizando *primers* específicos de 20 – 30 bases, complementares as seqüências que flanqueiam uma determinada seqüência repetitiva. Os segmentos amplificados a partir destes sítios de anelamento dos *primers* apresentam um elevado polimorfismo, produto da presença de diferenças no número de elementos repetidos. Desta forma, cada seqüência repetitiva, independentemente do elemento repetitivo (CA, GC, TG, ATC, etc...), constitui-se num *loci* gênico altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo em relação a uma espécie. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo *locus* dentro da população.

O uso da técnica de microssatélite tem aumentado nos últimos anos, principalmente devido à construção de bibliotecas de *primers* e aos avanços obtidos no sequenciamento automático, o que permitiu identificar as seqüências que flanqueiam os sítios repetitivos, para o desenho de *primers* complementares (MALONE & ZIMMER, 2005).

Os fragmentos gerados da amplificação podem ser visualizados tanto em géis de agarose, corados com brometo de etídio, quanto em géis de poliacrilamida, visualizados radioativamente ou mediante coloração com nitrato de prata. Os microssatélites são atrativos para os geneticistas, pois combinam várias vantagens: i) são codominantes (é possível separar homozigotos e heterozigotos); ii) multialélicos e altamente heterozigotos; iii) o elevado nível de polimorfismo detectável permite uma separação precisa de indivíduos aparentados; e, iv) além de

serem polimórficos, os microssatélites requerem quantidades mínimas de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

As principais desvantagem da técnica de microssatélites são o tempo e o custo envolvidos no desenho de cada *primer*, embora com o advento do sequenciamento de genomas e novas ferramentas de bioinformática, seja possível desenhar grande número de *primers* e testa-los em PCR *in silico*.

2.4.4 - Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP)

A técnica de AFLP consiste essencialmente em quatro etapas. Na primeira o DNA é clivado com enzimas de restrição. Na segunda, adaptadores específicos são ligados aos terminais dos fragmentos de DNA gerados pela clivagem. Na etapa, uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR utilizando *primers* especificamente desenhados para reconhecer a sequência dos adaptadores. Na quarta e última, a subpopulação de fragmentos amplificados é separada em gel de alta resolução como, por exemplo, géis de poliacrilamida revelados com auto-radiografia ou coloridas com nitrato de prata (ZABEAU, 1993).

A análise de AFLP combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição, preconizados na técnica de RFLP, com a aleatoriedade, a velocidade e praticidade da detecção do polimorfismo via PCR, preconizados pela técnica de RAPD. O polimorfismo genético ao nível de DNA detectado pela técnica de AFLP é resultado de mutações pontuais, inversões, deleções e inserções no DNA, as quais geraram modificações (perdas ou ganhos) nos sítios reconhecidos pelas enzimas de restrição, alterações na sequência reconhecida pelas bases seletivas no extremo 3' dos *primers* utilizados para a amplificação, ou alteraram o tamanho do fragmento gerado. Todas estas modificações ao nível de DNA foram acumuladas ao longo do tempo de evolução de cada espécie (MALONE & ZIMMER, 2005).

Como no caso da técnica RAPD, descrita anteriormente, a técnica AFLP é de herança dominante, ou seja, não é possível distinguir se uma banda presente no gel é originária de um indivíduo homozigoto ou heterozigoto para o *locus*. As bandas provenientes de indivíduos heterozigotos apresentam a metade da intensidade que as bandas provenientes de indivíduos homozigotos, mas sem uma excelente

padronização das concentrações iniciais de DNA, não é recomendado fazer este tipo de inferência.

A vantagem que mais destaca esta tecnologia das demais é indiscutivelmente o grande número de fragmentos que são gerados em um único gel. O índice *multiplex* do ensaio AFLP, ou seja, o número de marcadores simultaneamente gerados é o mais alto entre todas as tecnologias de marcadores hoje disponíveis, além de não haver necessidade de conhecimento prévio sobre a sequência de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Entretanto, o número de marcadores obtidos em determinada população é diretamente proporcional à diversidade ou dissimilaridade da população (MALONE & ZIMMER, 2005).

2.4.5 - cDNA-AFLP

As respostas biológicas são controladas pela regulação precisa da expressão gênica, sendo necessário o estudo de seus padrões para o entendimento dos diferentes processos. Uma variedade de técnicas moleculares está disponível para a identificação e clonagem de genes diferencialmente expressos, incluindo *differential display* (DD ou RT-PCR, coletivamente referidas como *RNA-fingerprinting*). Esses métodos apresentam, entretanto, limitações tais como reprodutibilidade, dificuldade em expressar mensagens muito raras e geração de falsos positivos. Esses problemas surgem primeiramente devido ao uso de *primers* com oligonucleotídeos arbitrários e pela necessidade de temperaturas de anelamento relativamente baixas para obter os produtos de amplificação (BACHEM et al., 1998).

O método do cDNA-AFLP (BACHEM et al., 1996) supera amplamente essas limitações e possibilita uma simples e rápida verificação da identidade da banda. Além disso, é possível a avaliação sistemática de quase todos os transcritos em um dado sistema biológico utilizando pequenas quantidades de material inicial.

A síntese do cDNA é realizada com a enzima transcriptase reversa, uma enzima de origem viral que tem a capacidade de produzir uma molécula de DNA dupla fita a partir da cópia de uma molécula de RNA mensageiro. Ou seja, como o nome diz, a transcriptase reversa faz o caminho contrário daquele percorrido pela RNA polimerase, que a partir de uma molécula dupla fita de DNA produz RNA. A técnica de cDNA-AFLP consiste nas mesmas etapas da técnica de DNA-AFLP, a

única mudança é a substituição do DNA genômico pelo cDNA (BACHEM et.al, 1998).

Atualmente, há grande interesse na incorporação de genes específicos no tegumento de soja, associados com o controle da embebição, com o aumento do potencial de armazenamento, redução da deterioração a campo e ainda redução na suscetibilidade a danos mecânicos (FRANÇA NETO & POTTS, 1979).

A identificação de genes relacionados a contrastes fenotípicos tem se mostrado extremamente eficiente através do isolamento de fragmentos de cDNA diferencialmente expressos fornecendo resultados confiáveis e reproduzíveis. Além disso, a principal vantagem dessa técnica é o fato de que ela não necessita de prévio conhecimento da sequência e, dessa forma, é útil para a descoberta de genes ainda desconhecidos (BACHEM et al., 1996).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Locais de execução do trabalho

- **Cultivo das sementes:** casa-de-vegetação situada na Estação Terras Baixas da Embrapa Clima Temperado (CPACT) - Pelotas/RS.
- **Caracterização estrutural dos tegumentos:** Laboratório de Imunologia e Microscopia Eletrônica da Embrapa Clima Temperado.
- **cDNA – AFLP:** Laboratório de BioSementes do Departamento de Fitotecnia – FAEM/UFPeL.
- **Análises da qualidade fisiológica das sementes:** Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia - FAEM/UFPeL.

3.2 – Obtenção do material vegetal

Nesse estudo foram utilizados dois genótipos de soja contrastantes para as características de tegumento: 1 - CD 202 (tegumento amarelo, permeável e suscetível à deterioração); 2 - TP (tegumento preto, semi-permeável e duro).

O experimento foi instalado em casa-de-vegetação, no dia 17 de novembro de 2005. As plantas foram cultivadas em condições homogêneas no interior de baldes de plástico preenchidos com solo. Foram semeadas cinco sementes por balde e após a emergência realizou-se o raleio deixando-se apenas duas plântulas por recipiente.

Para cada genótipo utilizaram-se quatro repetições de oito plantas resultando em um total de dezesseis baldes por genótipo.

A partir da antese iniciou-se a marcação de flores para que todas as sementes amostradas estivessem no mesmo estágio de desenvolvimento.

3.3 – Coleta das sementes

A coleta das sementes foi realizada em épocas diferentes para cada uma das avaliações:

Caracterização estrutural dos tegumentos: as sementes foram coletadas aos 25, 40 e 55 dias após a antese, cobrindo assim, todo período de formação do tegumento.

Análise de cDNA-AFLP: realizaram-se sete amostragens em intervalos de 5 dias (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 dias após a antese). Depois da coleta das sementes, o material vegetal foi encaminhado ao Laboratório de BioSementes do Departamento de Fitotecnia, FAEM/UFPel. Os tegumentos foram separados das sementes com auxílio de lâminas esterilizadas, tomando-se o cuidado de manter o tecido vegetal puro, ou seja, sem nenhum resquício de cotilédone ou qualquer outro tecido vegetal que não fosse tegumento. O material permaneceu estocado em *ultra freezer* a uma temperatura de -80°C até o momento da extração do RNA.

Qualidade fisiológica das sementes: foram coletadas sementes aos 70 dias após antese.

3.4 – Caracterização da qualidade fisiológica das sementes

A qualidade fisiológica das sementes de soja dos genótipos CD-202 e TP foi determinada através de testes de germinação e vigor (condutividade elétrica e envelhecimento acelerado).

3.4.1 - Teste de germinação

Foram utilizadas 400 sementes semeadas em rolos de papel toalha *Germitest* (com 25 sementes por rolo), umedecidos com uma quantidade de água de 2,5 vezes o peso do papel e colocados em temperatura constante (25°C). A avaliação foi realizada após o sétimo dia da semeadura de acordo com os critérios das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

3.4.2 – Teste de condutividade elétrica

Utilizaram-se quatro sub-amostras de 25 sementes (sem presença de sementes deformadas), as quais foram pesadas e em seguida, imersas em 75mL de água deionizada. As amostras foram mantidas em repouso a temperatura de 25°C. Após período de embebição de 24 horas, foram realizadas leituras da condutividade elétrica em condutivímetro digital expressando os resultados em ($\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$) (KRZYZANOWSKI et al., 1999).

3.4.3 – Teste de envelhecimento acelerado

Utilizou-se o método descrito por Krzyzanowski et al. (1999), conduzido com três repetições de 200 sementes (12 subamostras de 50), dispostas sobre uma bandeja de tela de arame galvanizado, fixado no interior de caixas plásticas (gerbox) as quais continham 40mL de água destilada. As amostras foram incubadas a temperatura constante de 41°C por 48 horas. Transcorrido esse período, as sementes foram colocadas para germinar seguindo os mesmos procedimentos utilizados no teste de germinação, realizando-se uma única contagem ao sétimo dia após a semeadura.

3.4.4 – Análise estatística

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a análise de variância utilizando o programa WINSTAT. As médias foram comparadas pelo teste Duncan 5% de significância.

3.5 – Caracterização estrutural dos tegumentos

As diferenças estruturais entre os tegumentos dos genótipos CD-202 e TP foram avaliadas através de microscopia ótica, realizada no Laboratório de Imunologia e Microscopia Eletrônica da CPACT. Os fragmentos de tegumentos foram retirados das sementes e afixados em resina, em seguida, realizaram-se

cortes transversais na região oposta ao hilo, utilizando ultramicrotomo “Leica”, com 1µm de espessura. O tecido vegetal foi corado com azul de metileno 1% e bórax 1%, e visualizado em microscópio ótico BX 51, em aumento de 40x.

3.6 – Obtenção dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos e avaliação do polimorfismo genético pela técnica de cDNA-AFLP

Partindo-se do pressuposto de que as diferenças estruturais existentes entre os tegumentos do genótipo CD-202 (permeável) e do genótipo TP (semi-permeável), são responsáveis por uma maior ou menor susceptibilidade a deterioração das sementes, analisou-se através de técnicas de biologia molecular, a identificação dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos entre os tegumentos desses genótipos, os quais possuem permeabilidade contrastante.

A técnica para obtenção dos fragmentos consistiu em extração do RNA total; obtenção do cDNA dupla fita; avaliação do polimorfismo genético pela técnica de cDNA-AFLP.

3.6.1 – Extração do RNA total

Para extração do RNA total dos tegumentos das sementes de soja, foram testados três protocolos de extração:

- 1 – Protocolo utilizando o reagente *Trizol* (Invitrogen®);
- 2 - Protocolo estabelecido por CHANG et al. (1993);
- 3 - Protocolo utilizando o reagente *Pure Link Plant RNA Reagent* (Invitrogen®).

Em cada um dos protocolos testados, realizou-se primeiramente o tratamento de todas as vidrarias, cadinhos, pistilos e demais utensílios necessários com água contendo 0,01% de dietilpirocarbonato (H_2O_{DEPC}), para evitar a ação de enzimas que degradam o RNA (RNases).

Cabe ressaltar que a extração do RNA total foi realizada separadamente para cada época de amostragem. No momento da síntese do cDNA dupla fita essas amostras de RNA foram misturadas e homogeneizadas, formando um *mix* de RNA.

3.6.1.1 – Protocolo utilizando *Trizol*

Acrescentou-se 1mL de *Trizol* em 100mg de tecido vegetal realizando a desestruturação da amostra com auxílio de um bastão de vidro. As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se uma centrifugação (12.000g/15 minutos a 4°C). Após a centrifugação, a amostra separou-se em quatro fases: uma com coloração vermelha, outra com fenol/clorofórmio, uma interfase e uma fase aquosa superior transparente, nessa fase superior é que estava presente o RNA. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga onde precipitou-se o RNA acrescentando 0,5mL de isopropanol. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos, e em seguida, centrifugadas (12.000g/10 minutos a 4°C). No próximo passo, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o RNA misturando a amostra em *vortex* com 1mL etanol 75%. Realizou-se uma nova centrifugação (7.500g/5 minutos a 4°C) e descartou-se o sobrenadante. Depois de secar, o RNA foi dissolvido em 25µL de água H₂O_{DEPC} e incubado a 60°C por 10 minutos.

A pureza e a integridade do RNA extraído foram mensuradas através de análise de absorbância (260/280nm) e eletroforese em gel de agarose 1,5% (SAMBROOK et al., 2001).

3.6.1.2 – Protocolo de Chang et al. (1993) - modificado

A desestruturação do material vegetal foi realizada com auxílio de nitrogênio líquido, acrescentando-se 400µL de tampão de extração CTAB em 100mg de tecido. Para precipitação das proteínas e demais componentes celulares foi adicionada uma solução de 500µL de clorofórmio, incubando-se à temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida centrifugando (6.500g/10 minutos). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo com 300µL de clorofórmio e centrifugado novamente (7.000g/10 minutos). No próximo passo, foi adicionado cerca de 1/3 do volume do sobrenadante de cloreto de lítio (10M). Após precipitar *over-night* a (4°C), a amostra foi centrifugada (8.000g/45 minutos) e o sobrenadante removido. O *pellet* foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 25µL de H₂O_{DEPC}.

A pureza e a integridade do RNA extraído foram mensuradas através de análises de absorbância (260/280nm) e eletroforese em gel de agarose 1,5% (SAMBROOK et al., 2001).

3.6.1.3 – Protocolo utilizando *Pure Link Plant RNA Reagent*

Realizou-se a desestruturação de aproximadamente 100mg do tecido vegetal (tegumentos), com auxílio de nitrogênio líquido. Esse material foi transferido para um tubo de microcentrífuga onde adicionou-se 0,5mL do *Pure Link Plant RNA Reagent* gelado (4 °C). A mistura foi obtida em *vortex* e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, mantendo-se o tubo na posição horizontal. Centrifugou-se a amostra (12.000g/15 minutos) em temperatura ambiente. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de microcentrífuga e adicionou-se 0,1mL de NaCl (5M). Em seguida, foram acrescentados 0,3mL de clorofórmio, centrifugando novamente as amostras (12.000g/10 minutos a 4 °C). Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo de microcentrífuga e adicionou-se igual volume de isopropanol. Deixou-se a mistura em repouso, por 10 minutos a temperatura ambiente. Realizou-se uma nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. Removeu-se o sobrenadante sem perder o *pellet* e adicionou-se 1mL de etanol 75%. Centrifugou-se temperatura ambiente (12.000 x g/1 minuto) e removeu-se o líquido tomando cuidado para não perder o *pellet*. A seguir, realizou-se uma centrifugação breve retirando-se o líquido residual com auxílio da micropipeta. O RNA extraído foi ressuscitado em 20µL de H₂O_{DEPC} e estocado a temperatura de – 80 °C até o momento da sua utilização.

A pureza e a integridade do RNA foram mensuradas através de análises de absorbância (260/280nm) e eletroforese em gel de agarose 1,5% (SAMBROOK et al., 2001).

3.6.2 – Obtenção do cDNA dupla fita

3.6.2.1 - Síntese da primeira fita do cDNA

O cDNA dupla fita foi sintetizado utilizando o *SuperScript Double Stranded cDNA Synthesis kit* (Invitrogen®).

Para síntese da primeira fita de cDNA foram acrescentados 9µL de H₂O_{DEPC} em 50µg de RNA total (contendo RNA extraído de tegumentos coletados nas diferentes épocas). Em seguida, adicionou-se a cada amostra, 1µL de *primer* Oligo dT (concentração de 100pmol/µL). Incubou-se essa mistura (70 °C por 10 minutos), e em seguida, colocou-se rapidamente o tubo no gelo. Na etapa seguinte, realizou-se uma centrifugação breve e adicionaram-se os seguintes componentes: 4µL de tampão de reação da primeira fita 5x [Tris-HCl 250mM (pH 8,3), KCl 375mM, MgCl₂ 15mM], 2µL de DTT (1M) e 1µL de dNTP (10Mm). Essa mistura foi obtida em *vortex*, coletando-se a amostra por centrifugação breve. Em seguida, incubou-se a amostra (45 °C por 2 minutos) e depois, acrescentou-se 2µL de SuperScript II RT, incubando-se novamente a amostra (45 °C por 1h). O último passo foi manter a amostra no gelo para finalizar a reação.

3.6.2.2 - Síntese da segunda fita do cDNA

Em banho de gelo, acrescentou-se 20µL de reação da primeira fita, com os seguintes componentes: 91µL de H₂O_{DEPC}, 30µL de tampão de reação da segunda fita 5x [Tris-HCl 250mM (pH 6,9), MgCl₂ β-NAD⁺ 450mM, (NH₄)₂SO₄ 50mM], 3µL de dNTP (10Mm) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1µL de DNA Ligase da *E. coli* (10U/µL), 4µL DNA Polimerase da *E. coli* (10U/µL), 1µL RNase H da *E. coli* (2u/µL). A mistura foi obtida em *vortex* e incubada (16 °C por 2h). Em seguida, adicionou-se 2µL (10 unidades) de T4 DNA Polimerase e incubou-se-se por mais 5 minutos. Transferiu-se a amostra para o gelo e adicionou-se 10µL de EDTA 0,5M e 160µL de fenol:clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). Homogeneizou-se a amostra em *vortex* e centrifugou-se (14.000g em temperatura ambiente). Removeu-se 140µL do sobrenadante e transferiu-se para um novo tubo de microcentrífuga. No passo seguinte, adicionaram-se 70µL de NH₄OAc e 0,5mL de etanol absoluto gelado. A mistura foi obtida em *vortex* e imediatamente centrifugou-se por 20 minutos nas mesmas condições descritas anteriormente. Removeu-se o sobrenadante lavando-se o *pellet* em etanol 70%. Centrifugou-se novamente (14.000g/2 minutos) e descartou-se o sobrenadante. Finalmente o cDNA foi incubado a 37 °C para evaporar o resíduo de etanol e depois, dissolveu-se o *pellet* em 6 µL de água ultrapura.

3.6.3 - cDNA-AFLP

A técnica de cDNA-AFLP é composta pelas etapas de digestão do cDNA com enzimas de restrição (*EcoR* I e *Mse* I), ligação de adaptadores específicos aos terminais dos fragmentos de cDNA gerados pela clivagem, pré-amplificação dos fragmentos de restrição utilizando os *primers* (*EcoR* I +**A** e *Mse* I +**C**), amplificação seletiva de fragmentos utilizando três bases seletivas (Tabela 2) e eletroforese dos fragmentos de cDNA amplificados em gel de poliacrilamida. Para execução dessa técnica utilizou-se o *AFLP Starter Primer Kit* (Invitrogen®). Nos próximos parágrafos, estão detalhados os passos que compõem cada uma dessas etapas.

3.6.3.1 - Reação de digestão do cDNA

Em um tubo de microcentrífuga foram adicionados os seguintes componentes: 3µL de tampão de reação 5x [Tris-HCl 50mM (pH 7,5), acetato de magnésio 250mM, acetato de potássio 50mM], 3µL de cDNA (150ng), 1,2µL *EcoR* I/*Mse* I [1,25u/µL em Tris-HCl 10mM (pH 7,5), NaCl 50mM, EDTA 0,1mM, DTT 1mM, 0,1mg/µL BSA, glicerol 50% (v/v), 0,1% Triton® x-100], 7,8µL de água ultrapura. Essa mistura foi homogeneizada e o conteúdo coletado através de centrifugação breve. Em seguida incubou-se a amostra (37°C por 2h) e depois, incubou-se novamente (70°C por 15 minutos) para inativar a restrição por endonucleases. O último passo foi colocar o tubo no gelo e coletar o conteúdo por centrifugação breve.

3.6.3.2 - Ligação de adaptadores

Ao cDNA digerido proveniente da etapa anterior, adicionou-se 14,4µL de solução de ligação de adaptadores [adaptadores *EcoR* I/*Mse* I, ATP (0,4mM), Tris-HCl 10mM (pH 7,5), acetato de magnésio 10mM, acetato de potássio 50mM] e 0,6µL de T4 DNA Ligase [1u/µL em Tris-HCl 10mM (pH 7,5), DTT 1mM, KCl 50mM, glicerol 50% (v/v)]. Homogeneizou-se a mistura, coletou-se o conteúdo da reação através de centrifugação breve e incubou-se amostra (20°C por 2h). Em seguida, realizou-se uma diluição da solução de ligação de 1:10 colocando 10µL da reação de ligação e acrescentando 90µL de tampão TE [Tris-HCl 10mM (pH 8,0), EDTA 0,1mM].

3.6.3.3 - Pré-amplificação

Em um microtubo de 0,2mL, foram adicionados 3µL do cDNA diluído da etapa anterior, 20µL do *primer mix* pré-amplificação, 2,5µL de tampão da PCR 10x+Mg [Tris-HCl 200mM (pH 8,4), MgCl₂ 15mM, KCl 500mM] e 0,5µL da enzima *Taq* DNA Polimerase (5u/µL). Em seguida, a amostra foi levada ao termociclador utilizando-se a seguinte programação: 20 ciclos de (94 °C por 30s; 56 °C por 60s e 72 °C por 60s). Após a PCR, Realizou-se uma diluição dessa amostra pré-amplificada transferindo-se 3µL da amostra e adicionando-se 147µL de tampão TE [Tris-HCl 10mM (pH 8,0), EDTA 0,1mM].

3.6.3.4 - Amplificação seletiva

Na reação de amplificação seletiva foram testadas 64 combinações de *primers* as quais estão assinaladas na Tabela 1.

Tabela 1 - Combinações de *primers* utilizados nas reações de amplificação seletiva na técnica de cDNA-AFLP.

	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CAT	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAC	√	√	√	√	√	√	√	√
E-AAG	√	√	√	√	√	√	√	√
E-ACA	√	√	√	√	√	√	√	√
E-ACC	√	√	√	√	√	√	√	√
E-ACG	√	√	√	√	√	√	√	√
E-ACT	√	√	√	√	√	√	√	√
E-AGC	√	√	√	√	√	√	√	√
E-AGG	√	√	√	√	√	√	√	√

Para cada par de *primer* escolhido foi necessário o preparo das seguintes soluções:

Mix 1: 1,0µL do *primer EcoR* I
 + 9,0µL do *primer Mse* I (contendo dNTPs)
 Total = 10µL (suficiente para 2 reações de amplificação)

Mix 2: 15,8µL de água ultrapura
+ 4,0µL de tampão de PCR (10X+Mg)
0,2µL de *Taq* DNA Polimerase (5u/µL)
Total = 20µL (suficiente para 2 reações de amplificação)

Mix 3: 5,0µL de cDNA diluído
+ 5,0µL de *mix 1*
10,0µL de *mix 2*
Total = 20µL (suficiente para 2 reações de amplificação)

Após o preparo das reações de amplificação seletiva, as amostras foram levadas ao termociclador (PTC 100–MJ Research) com a programação apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Programação do termociclador utilizada na reação de amplificação seletiva na técnica de cDNA-AFLP.

Programa	T(°C)	Tempo(s)	T(°C)	Tempo (s)	T(°C)	Tempo (s)	Nºciclos
1	94	60	65	60	72	90	1
2	94	60	64	60	72	90	1
3	94	60	63	60	72	90	1
4	94	60	62	60	72	90	1
5	94	60	61	60	72	90	1
6	94	60	60	60	72	90	1
7	94	60	59	60	72	90	1
8	94	60	58	60	72	90	1
9	94	60	57	60	72	90	1
10	94	60	56	60	72	90	1
11	94	30	56	30	72	60	23

3.6.4 - Detecção dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos

Para visualização dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos, realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida (5% de concentração) revelado com nitrato de prata. Essa metodologia é a mais utilizada para separação de

proteínas e moléculas de pequeno tamanho. No caso da técnica de AFLP, utilizam-se géis do tipo desnaturante, que realizam a separação de fragmentos de cDNA de fita simples.

3.6.4.1 – Preparo e montagem das placas

O gel de acrilamida foi preparado entre duas placas de vidro de comprimentos diferentes, utilizando-se espaçadores com 2mm de espessura. A placa maior recebeu um tratamento com uma solução de *Bind silane* que faz com que o gel permaneça aderido à placa no momento da revelação, enquanto a placa menor recebeu tratamento com uma solução repelente de *Repel silane* que permite que a placa menor descole com facilidade do gel após a eletroforese.

3.6.4.2 – Preparo da solução do gel de poliacrilamida (5%)

A solução do gel foi preparada utilizando-se os seguintes componentes:

- 22,5g de uréia;
- 10mL de TBE 5x (54g Tris-Base, 27,5g Acido Bórico, 20mL EDTA 0,5M (pH 8,0), completou-se com água deionizada até 1L e ajustou-se o pH do tampão até próximo a 8,3);
- 7,5mL de acrilamida:bisacrilamida 19:1 (38g de acrilamida, 2g de bisacrilamida completar até 100mL);
- Água deionizada quantidade suficiente para 50mL.

Os componentes foram dissolvidos em agitador magnético até a diluição total da uréia. Depois de a solução esfriar, acrescentou-se 360µL de APS (Persulfato de Amônio 10%) e 72µL de TEMED, e imediatamente verteu-se a solução no molde do gel.

Após a polimerização do gel, realizou-se uma pré-corrida em potência constante (60W) por aproximadamente 30 minutos. Em seguida procedeu-se a lavagem da região superior do gel injetando tampão com o auxílio de uma seringa. Antes da aplicação das amostras no gel, realizou-se uma desnaturação a 94 °C por 5 minutos, utilizando igual volume de tampão de desnaturação (*loading buffer*). Após a desnaturação, as amostras foram imediatamente resfriadas a 4 °C e aplicadas no

gel. Após 2 horas de corrida (60W), retirou-se a placa da cuba de eletroforese e iniciou-se o processo de revelação.

3.6.4.3 – Revelação do gel com Nitrato de Prata (BLEIDER, 1982 – modificado)

Esse método de revelação é baseado na oxidação do nitrato de prata ligado aos fragmentos de cDNA amplificados, presentes no interior do gel. Primeiramente retirou-se a placa menor na qual foi aplicada a solução repelente. Colocou-se a placa maior na qual o gel estava aderido em solução fixadora I (100mL de etanol (PA), 10mL de ácido acético (PA), completou-se o volume até 2L com água destilada), durante 20 minutos sob agitação orbital leve. Eliminou-se a solução fixadora I e realizou-se 2 lavagens de 5 minutos com água destilada. Descartou-se a água de lavagem e em seguida foi acrescentada a solução fixadora II (15mL de ácido nítrico e completou-se o volume até 2L com água destilada) deixando sob agitação orbital leve durante 3 minutos. A solução fixadora II foi eliminada procedendo-se em seguida, 2 lavagens de 5 minutos com água destilada. Acrescentou-se a solução de nitrato de prata (4g de nitrato de prata em água destilada, aprox. 200mL, depois se completou o volume até 2L com água destilada), deixando sob agitação orbital leve durante 30 minutos. Eliminou-se essa solução e procedeu-se uma lavagem rápida de 30 segundos com água destilada. Após eliminar a água de lavagem foram acrescentados 500mL da solução reveladora gelada (4°C) (60g de carbonato de sódio dissolvidos em 500mL de água destilada, sob agitação constante, completando-se o volume até 2L com água destilada gelada). Imediatamente antes da utilização da solução reveladora, acrescentou-se 1mL de formaldeído) até adquirir uma coloração preta. Eliminou-se os 500mL e adicionou-se o restante da solução reveladora deixando sob agitação orbital constante até o aparecimento das bandas. Retirou-se a solução reveladora e acrescentou-se a solução finalizadora (200mL de ácido acético 10% e completou-se o volume até 2L com água destilada), deixando sob agitação orbital leve até parar de formar bolhas. Eliminou-se a solução finalizadora e adicionou-se água destilada até a total cobertura do gel. Esperou-se o gel secar e finalmente foram identificadas as bandas polimórficas entre os genótipos CD – 202 e TP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Qualidade Fisiológica das Sementes

Conforme observado na tabela 3, comparando-se a qualidade fisiológica das sementes de soja dos genótipos CD – 202 e TP observa-se que não houve diferença significativa na germinação. Entretanto, em relação ao vigor, o genótipo TP apresentou desempenho superior ao genótipo CD – 202. No teste de envelhecimento acelerado, o genótipo TP apresentou 82% das plântulas normais, enquanto no genótipo CD – 202 esse valor foi apenas 52%. Com relação à condutividade elétrica, o valor obtido no genótipo CD – 202 foi $70\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$, superior ao do genótipo TP com $42\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$, demonstrando que as sementes com tegumento preto sofreram maior desestruturação das membranas celulares resultando em maior quantidade de íons lixiviados para a solução de embebição na execução do teste.

Isso pode ser atribuído à alta susceptibilidade do tegumento das sementes provenientes do genótipo CD – 202, pois nesse caso, as sementes foram produzidas em casa de vegetação e colhidas manualmente e ainda assim, o tegumento desse genótipo mostrou-se altamente frágil, com grande parte das sementes apresentando rachaduras no tegumento. Esses resultados corroboram com dados obtidos por França Neto & Potts (1979), ao constatarem que sementes de soja com tegumento permeável, apresentam maior incidência de danos mecânicos quando comparativamente a sementes de soja com tegumento semi-permeável. Além disso, esses pesquisadores afirmam que sementes com características de tegumento semi-permeável sofrem menos danos por umidade durante o processo de secagem. Estudos realizados por VIEIRA et al. (1987) também evidenciaram a existência de genótipos contrastantes para qualidade fisiológica da semente. Essas diferenças

podem existir em virtude da presença de sementes duras, as quais apresentam total ou parcial impermeabilidade à penetração de água no tegumento e, conseqüentemente, tornam-se menos susceptíveis aos danos mecânicos, às adversidades climáticas, à deterioração por umidade e ao ataque de patógenos.

Tabela 3 - Qualidade fisiológica de sementes de soja dos genótipos CD – 202 e TP (Tegumento Preto), produzidas em casa de vegetação, no ano agrícola 2005/06, município de Pelotas – RS. Pelotas, UFPel – 2007.

TESTES	Genótipo TP	Genótipo CD-202
Germinação (%)	86 a	84 a
Condutividade ($\mu\text{S.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$)	42,60 a	70,06 b
Envelhecimento (%)	82 a	52 b

Letras que diferem na linha significam diferenças significativas pelo teste Duncan 5% de probabilidade.

4.2 – Caracterização estrutural dos tegumentos

Através da microscopia obteve-se um aumento de 40x no tamanho das imagens, permitindo visualizar de forma clara as diferenças estruturais entre os tegumentos dos genótipos CD-202 e TP.

Observando-se a estrutura do tegumento das sementes de soja, pôde-se identificar a presença de três camadas: epiderme, hipoderme e células parenquimatosas (figuras 1 a 6). Neste estudo não foi possível avaliar a primeira camada do tegumento, ou seja, a cutícula. Essa estrutura já foi detalhadamente estudada por Ma et al. (2004) que afirmaram que a cutícula da camada paliçádica está relacionada à permeabilidade do tegumento, sendo que a cutícula do tegumento permeável seria mecanicamente frágil, desenvolvendo rachaduras durante a embebição, enquanto que no tegumento semi-permeável seria mecanicamente forte, não sofrendo rachaduras em condições normais.

Neste trabalho, foram observadas outras diferenças existentes, além da cutícula, entre a estrutura dos tegumentos de sementes de soja com permeabilidade contrastante, as quais podem interferir na deterioração das sementes.

Na parte externa do tegumento encontra-se a epiderme, camada formada por células paliçádicas chamadas macroesclerídeos (figuras 1 a 6). No genótipo TP, as células paliçádicas da epiderme apresentam-se mais alongadas (figura 1), enquanto que no genótipo CD-202 essas células possuem forma globulosa e justaposta (figura 2). Segundo Peske & Pereira (1983), a camada paliçádica é importante para absorção de água pela semente, pois, dependendo da sua constituição química, arranjo e substâncias intercelulares, a semente pode embeber água ou não.

Ainda na figura 1, observa-se que as células da epiderme do tegumento do genótipo TP apresentaram-se com um aspecto serrilhado, enquanto que no genótipo CD - 202 essas células permaneceram com a estrutura lisa (figura 2). Isso pode ser explicado pelo fato de que no genótipo TP, as células da epiderme são altamente lignificadas (Alvarez, 1997), conferindo ao tegumento desse genótipo maior resistência aos impactos mecânicos e consequentemente ao corte com ultramicrótomo. Já no genótipo CD – 202 as células da epiderme do tegumento cederam facilmente ao corte, por serem menos estruturadas e mais frágeis aos impactos mecânicos.

Comparando-se a estrutura da epiderme do genótipo TP (figuras 1, 3 e 5) com a do genótipo CD-202 (figuras 2, 4, e 6), observa-se que as células paliçádicas no genótipo TP apresentam alta quantidade de uma pigmentação escura. Essa coloração escura pode ser atribuída a um acúmulo de pró-antocianina ou antocianina, as quais estão presentes na epiderme de sementes de soja com tegumento preto, desde os estádios iniciais do desenvolvimento do tegumento (Todd & Vodkin, 1993). No entanto, nas fases iniciais da formação da semente essa pigmentação ainda não é visível, pois as sementes de soja do genótipo TP passam a adquirir coloração apenas a partir dos 50 dias após a antese (figura 7). Já o genótipo CD – 202, não acumula esses pigmentos e quando maduro, apresenta-se na coloração amarela (figura 8). Segundo Asiedu & Powell (1998), a cor do tegumento das sementes é uma característica associada com a permeabilidade à água. A pigmentação do tegumento das sementes também está correlacionada com a baixa taxa de absorção de água das sementes em algumas espécies de *Fabaceas*. Comparando-se tegumentos com e sem pigmentação, esses autores observaram uma maior taxa de embebição nas sementes que não apresentavam acúmulo de pigmentos.

Dados obtidos por Todd & Vodkin (1993) sugerem que sementes de soja com tegumento amarelo apresentam o alelo dominante do gene *I*, gene responsável pela coloração do tegumento. A presença desse alelo dominante inibe o acúmulo de antocianina nas paredes da epiderme do tegumento amarelo. Sementes de soja com tegumento preto não possuem esse alelo dominante e, portanto, apresentam acúmulo de antocianina nas paredes da epiderme. Segundo esses pesquisadores, em tegumentos pretos nos estádios iniciais de desenvolvimento, há presença de antocianinas vacuolares como *cyanidin* e *pelargonidin*. Já em tecidos de tegumentos maduros verifica-se a presença dos flavonóides *cyanidin*, *pelargonidin* e *delphinidin*.

Abaixo da epiderme encontra-se a hipoderme (figuras 1 a 6), camada unicelular formada por osteoesclerídeos, células esclerenquimatosas com parede celular de espessura desuniforme, as quais constituem uma camada de suporte com considerável espaço intercelular. A espessura da camada da hipoderme do tegumento do genótipo TP, apresentou-se maior que no tegumento do genótipo CD-202. Essa diferença foi mais evidente aos 40 dias de formação do tegumento, onde as células da hipoderme do genótipo TP apresentaram em torno de 11µm (figura 3) ao passo que no genótipo CD-202, essa camada mediu aproximadamente 6µm (figura 4), o que corresponde a uma diferença de 45%.

Avaliando-se a espessura das camadas da epiderme e hipoderme, observa-se que em todas as épocas avaliadas, essas camadas apresentaram-se mais espessas no genótipo TP que no genótipo CD-202. Esses resultados corroboram com o trabalho realizado por Horlings et al. (1991), onde sementes de soja de genótipos com tegumento preto apresentam maior espessura do tegumento quando comparado a genótipos com tegumento amarelo. Os autores afirmam que a maior espessura do tegumento confere à semente maior resistência à deterioração no campo.

Comparando-se os tegumentos jovens, (figuras 1 e 2), com os tegumentos já maduros (figuras 5 e 6), constata-se que as estruturas que compõem o tegumento das sementes de soja já estão presentes aos 25 dias após a antese. Nos tegumentos mais maduros, ou seja, 55 dias após a antese (figuras 5 e 6), observa-se que há uma diminuição na espessura das camadas da epiderme e hipoderme, o que pode ser atribuído a uma compressão dessas camadas provocada pelo crescimento dos cotilédones.

A terceira e última camada visualizada no tegumento das sementes de soja é uma camada formada de células parênquimatosas (figura 1). Estas células possuem forma mais ou menos cilíndrica e parede celular fina, formando uma estrutura com a sobreposição de 6 a 8 camadas de células. Nessa camada, foram observadas diferenças no formato e organização dessas células. Entretanto, não foram encontrados na bibliografia dados que afirmem existir relação dessa camada com características de resistência do tegumento.

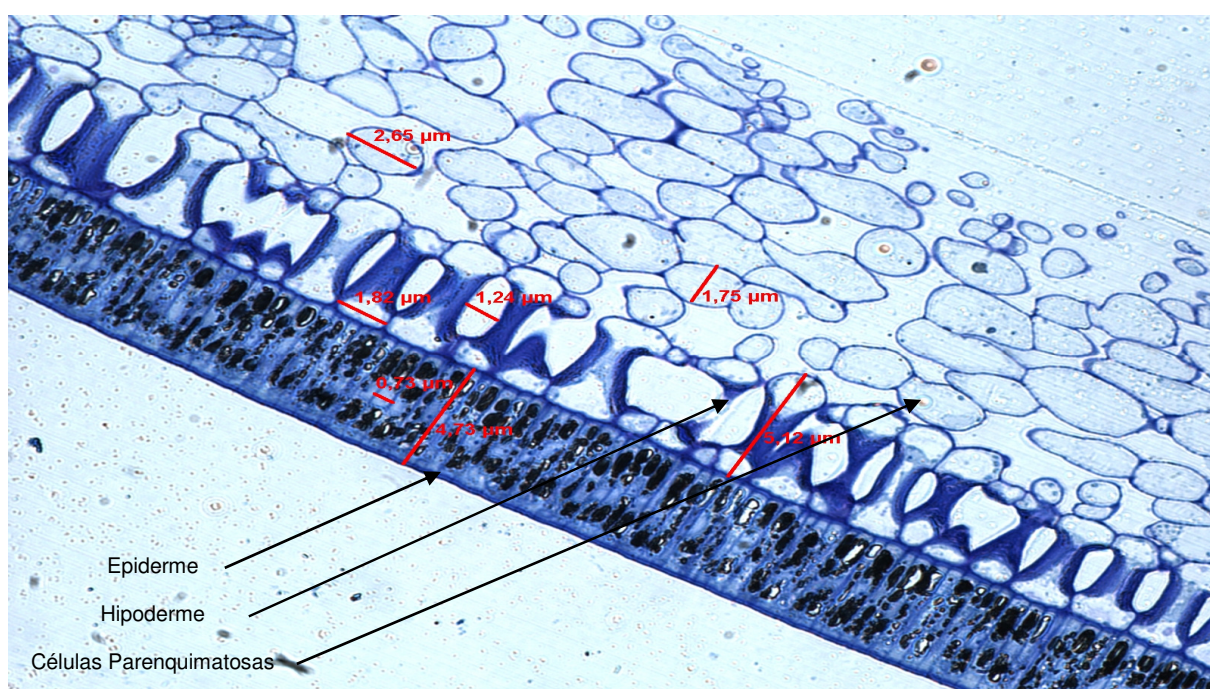


Figura1 – Tegumento de soja do genótipo TP, coletado 25 dias após a antese em corte transversal com ultramicrotomo, corado com azul de metileno e bórax 1%, e visualizado em microscópio ótico, com aumento de 40x. Pelotas, UFPel – 2007.

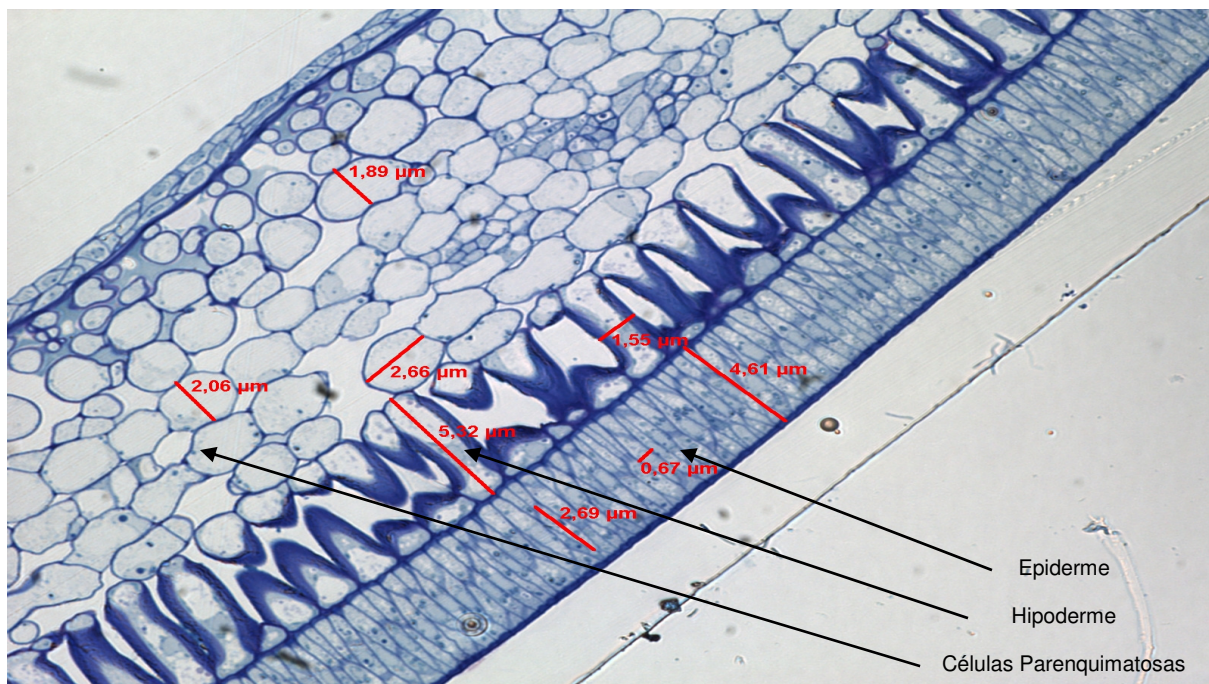


Figura 2 – Tegumento de soja do genótipo CD-202, coletado 25 dias após a antese em corte transversal com ultramicrotomo, corado com azul de metileno e bórax 1%, e visualizado em microscópio, com aumento de 40x. Pelotas, UFPel – 2007.

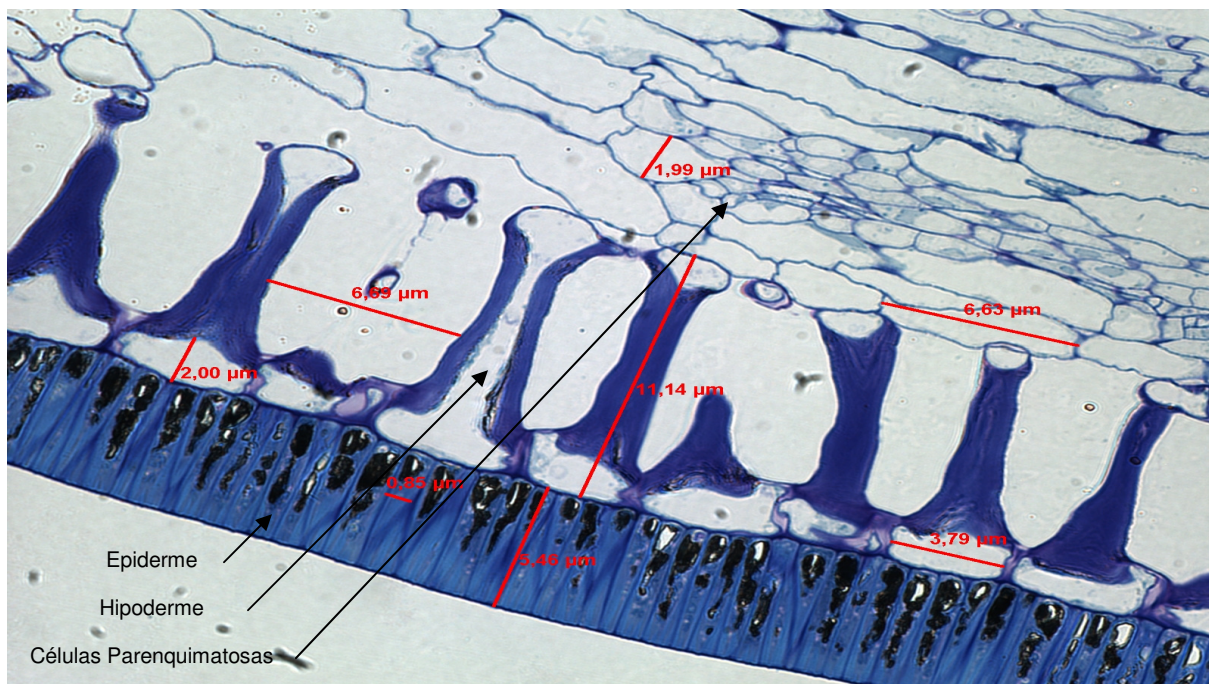


Figura 3 – Tegumento de soja do genótipo TP, coletado 40 dias após a antese em corte transversal com ultramicrotomo, corado com azul de metileno e bórax 1%, e visualizado em microscópio ótico com aumento de 40x. Pelotas, UFPel – 2007.

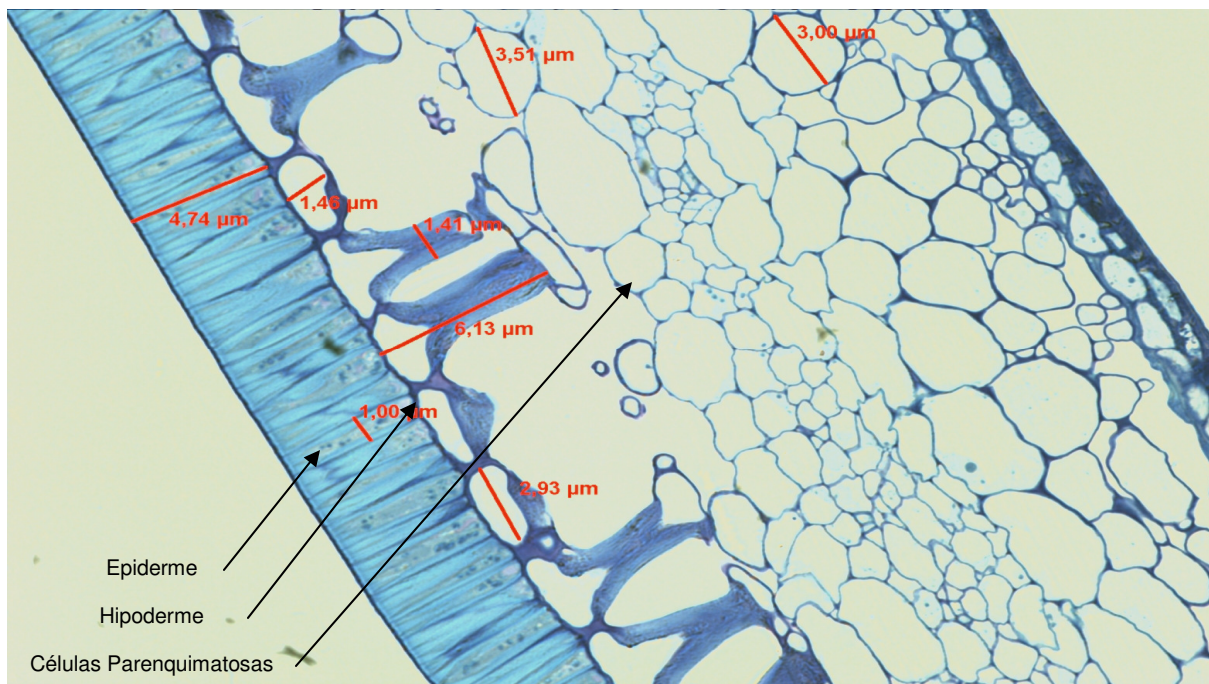


Figura 4 – Tegumento de soja do genótipo CD – 202, coletado 40 dias após a antese em corte transversal com ultramicrotomo, corado com azul de metileno e bórax 1%, e visualizado em microscópio ótico, com aumento de 40x. Pelotas, UFPel – 2007.

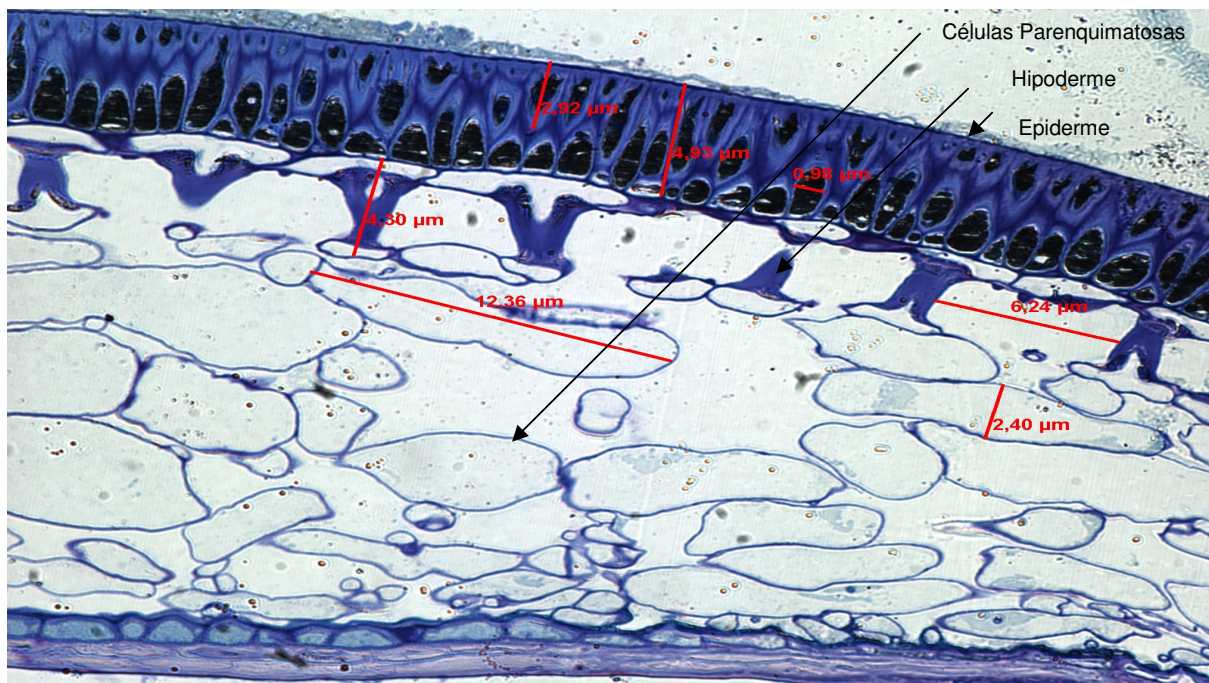


Figura 5 – Tegumento de soja do genótipo TP, coletado 55 dias após a antese em corte transversal com ultramicrotomo, corado com azul de metileno bórax 1%, e visualizado em microscópio ótico, com aumento de 40x. Pelotas, UFPel – 2007.

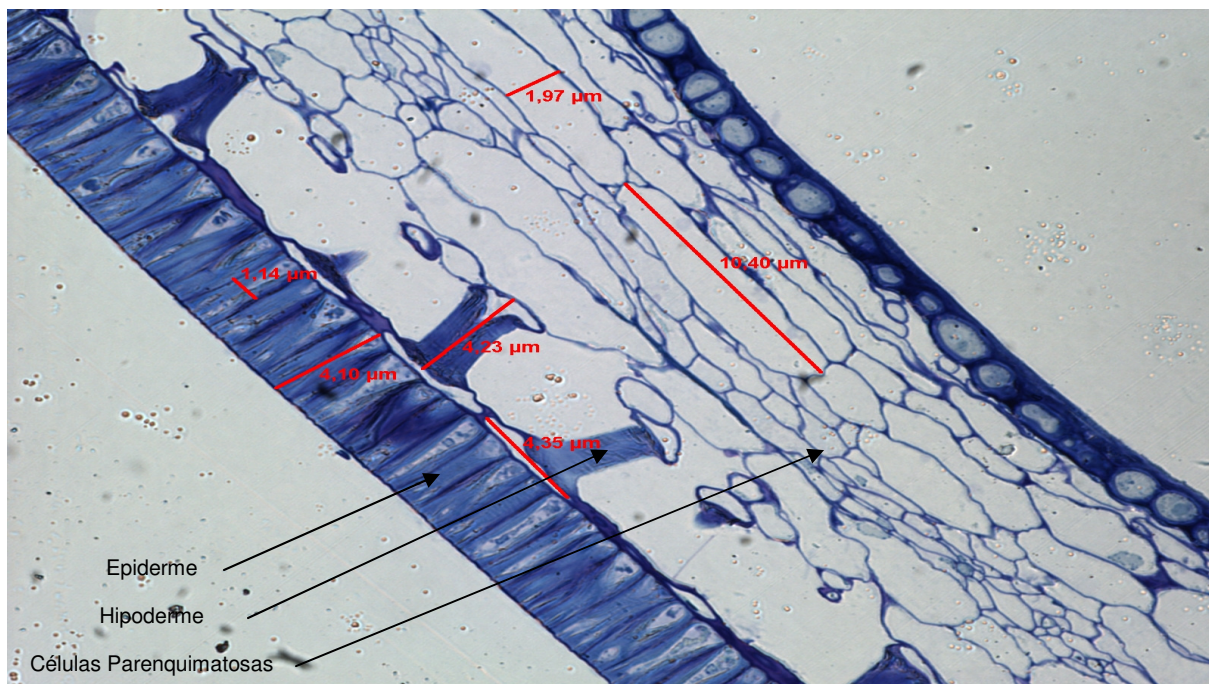


Figura 6 – Tegumento de soja do genótipo CD – 202, coletado 55 dias após a antese em corte transversal com ultramicrotomo, corado com azul de metileno e bórax 1%, e visualizado em microscópio ótico com aumento de 40x. Pelotas, UFPel – 2007.

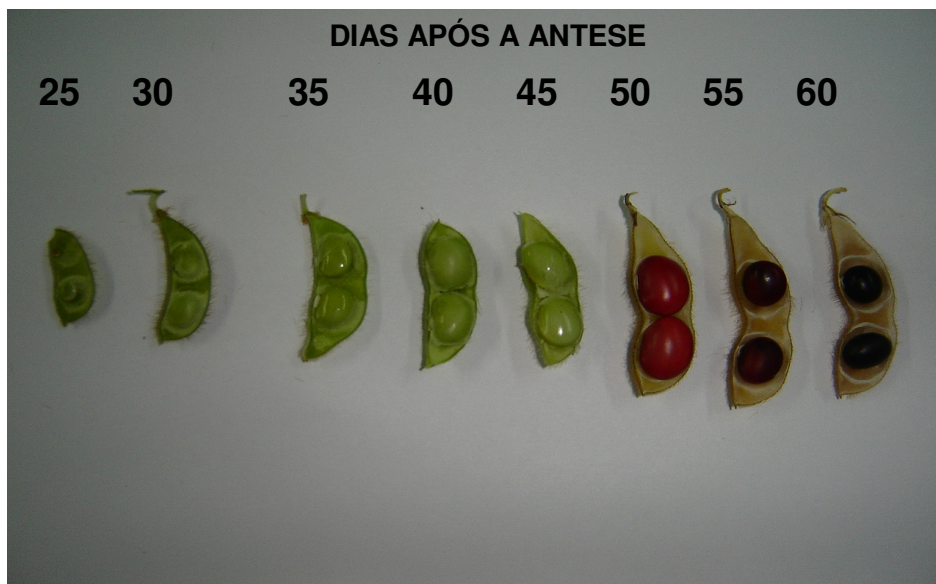


Figura 7 - Coloração do tegumento de sementes de soja do genótipo TP em diferentes fases de desenvolvimento. Pelotas – UFPel, 2007.

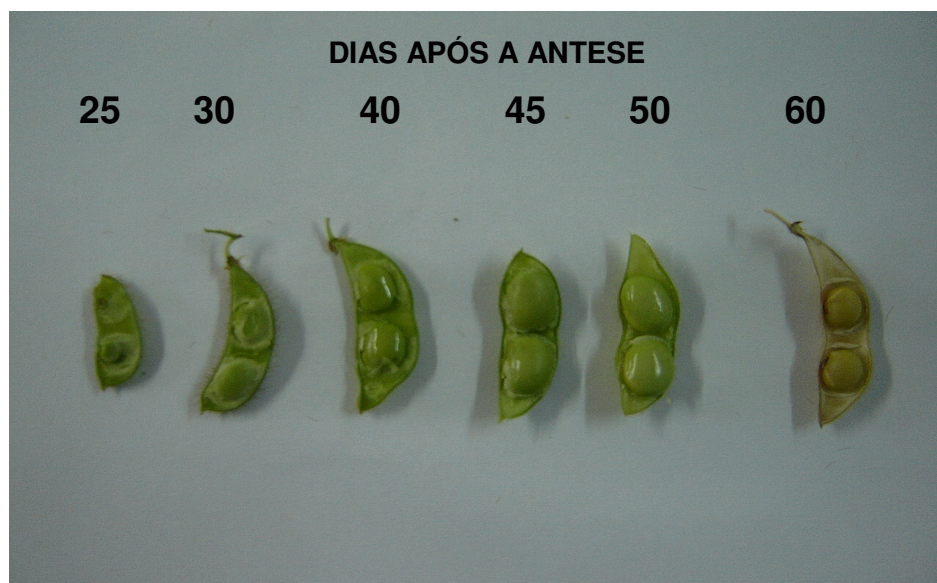


Figura 8 – Coloração do tegumento de sementes de soja do genótipo CD - 202 em diferentes fases de desenvolvimento. Pelotas – UFPel, 2007.

4.3 - Obtenção dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos pela técnica de cDNA-AFLP

4.3.1 – Avaliação de protocolos de extração do RNA total

Um dos requisitos fundamentais para obter-se sucesso com a técnica de cDNA-AFLP, consiste na obtenção de RNAs com qualidade e em quantidade suficiente.

O método do *Trizol* é recomendado para extração de RNA total de tecidos e células de humanos, plantas, animais e bactérias, mantendo o RNA extraído íntegro e livre de DNA e proteínas. Esse método, entretanto, foi eficiente apenas para extração de RNA dos tegumentos provenientes do genótipo CD-202 enquanto que para o genótipo TP esse protocolo não funcionou (Figuras 8A e 8B).

A dificuldade de extrair RNA desses tecidos pode ser explicada por estudos realizados por Tood & Vodkim (1993), os quais demonstram que proteínas e RNA de sementes com tegumento preto são difíceis de serem extraídos. A presença de pró-antocianinas e antocianinas em tegumentos de sementes de soja de coloração preta

ou marrom, interage com o RNA formando um complexo que altera o espectro de absorbância, a migração do RNA e a capacidade de hibridização do RNA com DNA.

Com base neste resultado foram testados outros protocolos de extração recomendados para tecidos que possuem alta quantidade de fenóis, como o protocolo estabelecido por Chang et al. (1993). Esse protocolo extraiu RNA de ambos os genótipos, porém, a quantidade de RNA extraído foi insuficiente para a síntese do cDNA (Figura 8C e 8D). O terceiro método testado foi o protocolo do *Pure Link Plant RNA Reagent*, esse reagente é recomendado para isolamento de RNA total de alta qualidade, de tecidos de plantas, especialmente aqueles que apresentam alto conteúdo de polifenóis (como o caso das sementes com tegumento preto). A utilização desse reagente foi extremamente eficiente para extração de RNA total de tegumentos em ambos os genótipos (Figuras 8E e 8F). A quantidade de RNA extraído por esse método foi bem superior em relação aos demais protocolos testados, sendo suficiente para a síntese do cDNA dupla-fita, originando um cDNA de qualidade, adequado para a utilização na técnica de cDNA-AFLP.

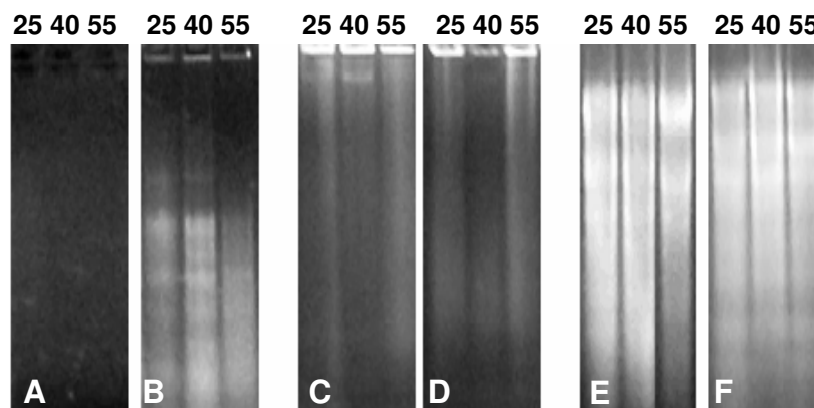


Figura 9 - RNA total em gel de agarose 1,5%, isolado de tegumentos de sementes de soja (*Glycine max*) em três estádios de desenvolvimento (25, 40 e 55 dias após a antese), utilizando três protocolos de extração (Trizol (Invitrogen); Chang et al. (1993) modificado; Pure Link Plant RNA (Invitrogen)). A - Genótipo TP (tegumento preto) Trizol; B - Genótipo CD-202 Trizol; C- Genótipo TP Chang; D- Genótipo CD-202 Chang; E- Genótipo TP Pure Link Plant RNA; F- Genótipo CD-202 Pure Link Plant RNA.

4.3.2 – Seleção dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos

Na figura 9, estão os resultados obtidos através da eletroforese em gel de poliacrilamida, de três dos 64 pares de *primers* testados.

Os fragmentos selecionados foram os que se apresentaram diferencialmente expressos entre os tegumentos dos dois genótipos, os quais estão indicados na figura através de setas.

Comparando-se o padrão de bandas obtidos com o *primer* um é possível observar a presença de seis bandas polimórficas entre os dois genótipos, quatro no genótipo TP e três no genótipo CD-202.

Já a segunda combinação de *primers* testada, apesar de ter gerado um bom padrão de bandas, não apresentou nenhum fragmento de cDNA diferencialmente expresso.

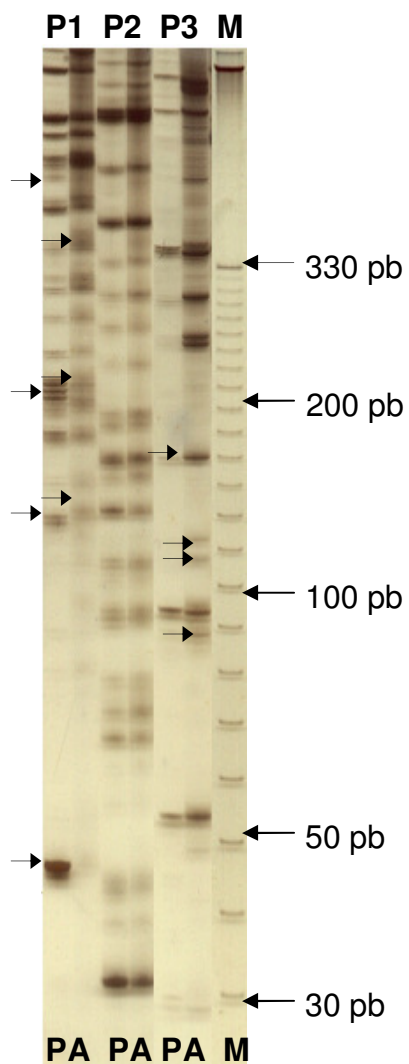


Figura 10- cDNA-AFLP em gel de poliacrilamida 5%, corado com nitrato de prata, em tegumentos de sementes de soja (*Glycine max*) de dois genótipos, (**P**) genótipo com tegumento preto e (**A**) genótipo CD-202, utilizando três diferentes combinações de *primers* (**P1**-*EcoRI*-AAG/*MseI*-CTC, **P2**-*EcoRI*-ACA/*MseI*-CTT and **P3**-*EcoRI*-AGG/*MseI*-CTC. **M**-30-330 DNA ladder).

A terceira combinação de *primers* possibilitou a seleção de quatro fragmentos no genótipo CD-202.

Das 64 combinações de *primers* testadas, foi possível identificar um total de 47 bandas polimórficas, o que pode ser considerada uma quantidade satisfatória, já que essas bandas selecionadas representam fragmentos de genes diferencialmente expressos entre os dois genótipos e dessa forma são promissores para o desenvolvimento de marcadores relacionados a caracteres do tegumento. Dentre 64 as combinações, 36 destas não permitiram a seleção de nenhum fragmento diferencialmente expresso, algumas, por não apresentarem polimorfismo e outras, por não permitirem uma amplificação adequada o que impossibilitou a seleção de fragmentos, já que esse fator levaria a um processo de seleção com maior subjetividade.

O tamanho dos fragmentos selecionados foi variável. Foram obtidos desde fragmentos maiores com mais de 330 pb (pares de bases) até fragmentos menores em torno de 50 pb o que pode ser observado na figura 9.

Para validação desses marcadores será necessário, além do seqüenciamento, a utilização de ferramentas adicionais que confirmem a expressão diferencial desses fragmentos selecionados. Técnicas como de hibridização com sondas específicas ou análise de PCR em tempo real podem ser alternativas adequadas para este fim.

Aoki et al. (2005) utilizou a técnica de cDNA-AFLP visando a identificação de genes relacionados a característica de resistência ao estresse salino em soja. Esses pesquisadores obtiveram resultados positivos utilizando técnicas de hibridização e confirmando se os fragmentos obtidos expressavam-se em outros órgãos da planta além das folhas, como nas raízes e haste.

A partir da identificação dos fragmentos de genes mediante estudos de seqüenciamento com posterior caracterização, será possível identificar genes relacionados a características do tegumento e indiretamente relacionados com a qualidade fisiológica das sementes. Além disso, o sequenciamento desses fragmentos poderá auxiliar o entendimento dos processos fisiológicos relacionados a características do tegumento das sementes, assim como a construção de marcadores moleculares para seleção assistida em programas de melhoramento o que resultará em maior rapidez e eficiência no desenvolvimento de variedades em que o fator qualidade de sementes apresente alta prioridade.

5. CONCLUSÕES

- Existem diferenças entre as estruturas dos tegumentos de soja de coloração amarela e coloração preta as quais podem estar relacionadas à permeabilidade do tegumento e indiretamente relacionadas à qualidade das sementes.
- A técnica de cDNA-AFLP é eficiente para identificação de fragmentos de genes diferencialmente expressos entre os tegumentos de sementes de soja com características de permeabilidade contrastantes.
- Sementes com tegumento preto apresentaram qualidade fisiológica superior em relação às sementes com tegumento amarelo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AOKI, A.; KANEGAMI, A.; MIHARA, M.; KOJIMA, T.; SHIRAIWA, M.; TAKAHARA, H. Molecular cloning and characterization of a novel soybean gene encoding a leucine-zipper-like protein induced to salt stress. **Science Direct**, v.356, p.135-145, 2005.

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

BACHEM, C.W.; OOMEN, R.J.F.; VISSER, R.G. Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.16, p.157-173, 1998.

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

BEIDLER, J.L.; HILLIARD, P.R.; RILL, R.L.; Ultra sensitive staining of nucleic acids with silver nitrate. 1982.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Regras para Análise de Sementes. Brasília: Departamento Nacional de produção Vegetal. 1992. 365p.

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

CARVALHO, N. M. & NACAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3ª edição. Campinas, S.P.: Fundação Cargill, 1988. 424p.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolation RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.11, p.113-116, 1993.

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

FEDERIZZI, L.C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S.C.K., **Marcadores Moleculares em Plantas**, 1998. p.3-15

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

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

FRANÇA NETO, J.B.; POTTS, H.C. Efeitos da colheita mecânica e da secagem artificial sobre a qualidade da semente dura em soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.01, n.2, p.64-77, 1979.

GAZZONI, D.L. Botany. In: Embrapa-CNPSo. **Tropical soybean improvement and production**. Plant Production and Protection Series n°27. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nation, 1994. p.1-12.

GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Editora UFV, 1999. p. 715-740.

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

HENNING, A.A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais**. 2 ed. – Londrina: Embrapa Soja, 2005. 52p.

HORLINGS, G.; GAMBLE, E.E.; SHANMUGASUNDARAM, S. The influence of seed size and seed coat characteristics on seed quality of soybean in the tropics:field weathering. **Seed Science and Technology** , v.9, p.665-685, 1991.

KRZYZANOWSKI, R.D.V.; VIEIRA, R.D. & FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

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

MALONE, G.; ZIMMER, P.D. Marcadores Moleculares. In: **Ferramentas da biotecnologia no melhoramento genético vegetal**. Pelotas: UFPel, 2005, p.78-114.

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

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. CONAB, 2005. Acesso em fevereiro de 2007. On-line. Disponível na Internet: [http:// www.conab.gov.br/safras.asp](http://www.conab.gov.br/safras.asp).

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

NEDEL, J.L. Fundamentos da qualidade de sementes. In: **Sementes fundamentos científicos e tecnológicos**. Pelotas: UFPel, 2003, p.95-138.

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

RAGUS, L.N. Role of water absorbing capacity in soybean germination and seedling vigour. **Seed Science and Technology**, v15 p. 285-296, 1987.

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

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W.; **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 3ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, 2001.

SHUSTER I. O DNA da semente, 2003. Acessado em fevereiro de 2007. On-line. Disponível na Internet: [http:// www.coodetec.com.br/artigos](http://www.coodetec.com.br/artigos).

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

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

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, p. 147-153, 1987.

TODD, J. J.; VODKIN, L.O.; Pigmented soybean (*Glycine max*) seed coats accumulate proanthocyanidins during development. **Plant Physiol.** v.102, p.663-670, 1993.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Res.** v.18, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.

VIEIRA, R.D; ARANHA, L.R.S.; ATHAYDE, M.L.F.; BANZATTO, D.A. Produção, características agronômicas e qualidade fisiológica de sementes de cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Científica**, São Paulo, v.15, n.1, p.127-136, 1987.

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