

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
SEMENTES**



Tese

**GERAÇÃO DE cDNAs, *PRIMERS* E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL
DO TEGUMENTO DE SEMENTES DE SOJA**

HELEN LÚCIA DA CRUZ MIRANDA

Pelotas, 2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
SEMENTES**



**GERAÇÃO DE cDNAs, *PRIMERS* E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL
DO TEGUMENTO DE SEMENTES DE SOJA**

HELEN LÚCIA DA CRUZ MIRANDA

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Dejalma Zimmer, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes.

Pelotas, 2008

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Dejalma Zimmer (UFPel)

Prof. Dr. Antonio Carlos Souza Albuquerque Barros (UFPel)

Prof. Dr. Vilmar Luciano Matei (UFPel)

Prof. Dr. Nei Fernandes Lopes (UFPel)

Pesq. Dr. Ademir dos Santos Amaral

Aos meus amores:

Meu esposo Márvio e ao nosso filho, Martim;

Meus pais, Vera Lúcia e Luiz Carlos;

Minhas irmãs, irmão e afilhado;

*Pelo amor, compreensão,
incentivo e apoio em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel - Universidade Federal de Pelotas;

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e suporte financeiro;

Ao professor Dr. Paulo Dejalma Zimmer pela orientação, amizade e dedicação;

Ao professor Dr. Francisco Amaral Vilella pela amizade, colaboração, apoio e incentivo em todos os momentos;

Ao professor Dr. César Valmor Rombaldi, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial/FAEM/UFPel por permitir a utilização das dependências e equipamentos dos laboratórios para condução dos experimentos;

Ao professor Dr. Antônio Costa de Oliveira, do Departamento de Fitotecnia/FAEM/UFPel por permitir a utilização das dependências e equipamentos dos laboratórios para condução dos experimentos;

Ao professor Dr. Odir Antônio Dellagostin, do Centro de Biotecnologia CENBIOT/UFPel por permitir a utilização das dependências e equipamentos dos laboratórios para condução dos experimentos;

Às grandes amigas Cibele dos Santos Ferrari, Katiane da Rosa Gomes da Silva, Patrícia Vinholes, Fernanda Amaral e ao grande amigo Geri Eduardo Meneghello, pela imprescindível colaboração, amizade, carinho, apoio e incentivo no decorrer da jornada.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes pelo apoio, amizade e presteza;

À todos meus amigos, pelo companheirismo, e apoio e a todos que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho;

À todos de minha família, que sempre souberam entender todas as minhas ausências e me apoiaram em todos os momentos com muito amor e dedicação.

À Deus, pela vida;

RESUMO

MIRANDA, Helen Lúcia da Cruz. **Geração de cDNAs, primers e caracterização estrutural do tegumento de sementes de soja.** 2008. 53 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A soja é uma das principais *commodities* mundiais e a semente o principal insumo para sua produção. O tegumento das sementes é o principal modulador da qualidade, podendo ser encontrado, nessa estrutura a resposta para a produção de sementes com caracteres superiores para vigor e viabilidade. O estudo teve como objetivo identificar características estruturais contrastantes, obter cDNA e desenhar *primers* relacionados à síntese de lignina e deposição de cera em tegumentos de sementes de soja de genótipos contrastantes em relação à permeabilidade CD 202 (permeável) e IAC Santa Maria 702 (semipermeável). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação e a partir da primeira floração as flores foram marcadas para que o tempo de desenvolvimento de cada legume fosse identificado. Legumes com 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 dias de desenvolvimento foram coletados e os tegumentos extraídos e armazenados para extração de RNA. Tegumentos com 25, 40, 55 e 70 dias de desenvolvimento dos genótipos de soja CD 202 e IAC Santa Maria 702 também foram submetidos a Microscopia Eletrônica. Após a extração do RNA total, foram obtidos os RNAm, seguido do cDNA. Em paralelo foi realizada análise *in silico* para desenho de *primers* específicos de genes envolvidos na rota metabólica da lignina e na deposição de cera nas sementes. Foram detectadas diferenças na espessura da camada paliçádica dos tegumentos de sementes de soja dos genótipos CD 202 e IAC Santa Maria 702. O protocolo a base de cloreto de lítio foi eficiente para extrair RNA total de ambos os genótipos em todas as fases de coleta. A estratégia de multiplicação unidirecional do cDNA foi eficiente para geração de um volume considerável para o desenvolvimento de estudos futuros de expressão diferencial de genes. A análise *in silico* permitiu o desenvolvimento de 16 *primers* relacionados aos genes da lignina e da elongase.

Termos para indexação: *Glycine max*, tegumento, lignina, alongase, permeabilidade.

ABSTRACT

MIRANDA, Helen Lúcia da Cruz. **Cdna, primers development and structural characterization of the soybean seed coat.** 2008. 53 p. Doctor in Sciences - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Soybean is one of the main world commodities and the seed is the key for high yields in this culture. Nevertheless, the soybean seed coat is the main modulator of seed quality, so, in this structure we could find answers for high seed quality production. The study goal is to identify structural contrasting traits, to obtain cDNA and to draw primers related to lignin synthesis and wax deposition in seed coat from two soybean genotypes. Plants were grown in greenhouse, flowers were identified and dated to follow the development after flowering until legumes were harvested (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 and 60 days). Seed coats were then analyzed in electronic microscopy and used to build a soybean seed coat cDNA library for permeability traits (lignin synthesis and wax deposition). In silico, analyzes were performed to obtain specific primers to detect soybean seed coat lignin and wax biosynthesis genes. According to the seed coat traits, we identified differences in the palisade cell thickness between genotypes. The protocol based on litió chloride was efficient to extract total RNA from both genotypes in all phases. The unidirectional cDNA multiplication was efficient for the generation of enough cDNA quantity for future projects. In silico analyzes allowed the development of 16 primers related to lignin and wax deposition biosynthesis in soybean seed coat.

Key-words: Glycine max, seed coat, lignin, elongase, permeability.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Detalhes do cultivo da soja em casa de vegetação. No detalhe é possível observar a marcação das flores para posterior coleta dos legumes..... 12
- Figura 2** Legumes contendo sementes nos estádios compreendidos entre 25 e 60 dias de desenvolvimento dos genótipos CD 202 (A e B) e IAC Santa Maria 702 (C e D).....13
- Figura 3** Detalhes dos legumes de soja contendo as sementes, da extração dos tegumentos e do acondicionamento destes em ependorf..... 15
- Figura 4** Rota metabólica de chave na produção de compostos do tegumento da soja – lignina..... 18
- Figura 5** Estrutura dos tegumentos do genótipo CD 202 com A- 25 dias, B- 40 dias, C- 55 dias e D- 70 dias de desenvolvimento..... 21
- Figura 6** Estrutura dos tegumentos do genótipo IAC Santa Maria 702 com A- 25 dias, B- 40 dias, C- 55 dias e D- 70 dias de desenvolvimento 22
- Figura 7** Gel de agarose com amostras de RNA total obtido de tegumentos do genótipo IAC Santa Maria 702 (canaletas 1 a 5) e genótipo CD 202 (canaletas 6 a 10) por meio do protocolo de extração Trizol® Reagent24
- Figura 8** Gel de agarose com amostras de RNA total obtido de tegumentos do genótipo IAC Santa Maria 702 (canaletas 1 a 6) e genótipo CD 202 (canaletas 7 a 12) por meio do protocolo de extração contendo cloreto de lítio, modificado por CHANG et al. (1993).....25
- Figura 9** Gel de poliacrilamida 6% contendo cDNA obtido dos tegumentos dos genótipos CD 202 e IAC Santa Maria 702 a partir de RNA total extraído pó meio do método de cloreto de lítio, modificado por CHANG et al. (1993) e purificado com o kit *FastTrack® 2.0* (Invitrogen).25
- Figura 10** Alinhamento das ESTs GI 17153492 e GI 11412251 correspondentes ao gene que codifica para à elongase da soja. O * indica similaridade de nucleotídeos na posição, atingindo 88%. Os *primers* foram desenhados na região conservada.....28

LISTA DE TABELA

Tabela 1 Características dos <i>primers</i> desenhados que serão utilizados em estudos futuros buscando contrastes genotípicos nos tegumentos dos genótipos CD 202 e IAC Santa Maria 702	27
---	----

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Soja	3
2.2. Estrutura e características do tegumento de sementes de soja	4
2.3. Lignina e Elongase	6
2.4. Biologia Molecular na Ciência e Tecnologia de Sementes	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Cultivo de sementes de soja para obtenção de tegumentos em estádios distintos de desenvolvimento.....	11
3.2. Microscopia Eletrônica dos tegumentos de soja em diferentes estádios de desenvolvimento	13
3.3. Análise Molecular	14
3.3.1. Obtenção dos tegumentos para extração do RNA total	14
3.3.2. Extração do RNA Total	15
3.3.3. Quantificação do RNA Total	16
3.3.4. Purificação do RNA mensageiro	16
3.3.5. Síntese do cDNA	17
3.3.6. Construção dos <i>Primers</i>	17
3.3.7. Amplificação geométrica do cDNA CD 202 e IAC Santa Maria 702 com os <i>primers Sal I e Not I</i>	19
3.3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Análises comparativas da estrutura dos tegumentos CD 202 e IAC Santa Maria 702 por meio de microscopia eletrônica	20
4.2. Geração dos cDNAs	23
4.2.1 Obtenção do RNA total, RNA mensageiro e cDNA	23
4.3. Desenho dos <i>primers</i>	26

5. CONCLUSÕES	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ANEXOS	35

1. INTRODUÇÃO

A soja é uma das principais *commodities* mundiais, possuindo demanda de consumo superior a 180 milhões de toneladas. O Brasil é o segundo maior produtor de soja, produzindo 57,6 milhões de toneladas na safra 2007. Neste sentido, é necessário um sistema de produção de sementes apoiado na pesquisa, visando novas tecnologias que assegurem produtos de alta qualidade e competitivos para o mercado.

A tecnologia de sementes tem papel fundamental dentro do sistema de produção de sementes para assegurar alta qualidade relacionada a características genéticas, físicas, fisiológicas e sanitárias (KRZYZANOWSKI, 1998). No entanto, esta tecnologia atua de forma paliativa, havendo a necessidade de pesquisas que tragam maiores benefícios para a produção de sementes. Estudos fisiológicos com enfoque genético-molecular podem conduzir à elucidação e/ou melhor entendimento de rotas metabólicas envolvidas com a qualidade de sementes. Neste contexto, a biologia molecular é uma ótima ferramenta para identificação de genes envolvidos no metabolismo. Os genes encontrados possibilitarão a construção de sondas e marcadores moleculares, o que permitirá a implantação de SAMM (Seleção Assistida por Marcadores Moleculares) em programas de melhoramento com o objetivo de identificar genótipos superiores para características de interesse à fisiologia da semente.

Por meio da engenharia genética há possibilidade de transferência de genes de interesse para outros genótipos. Atualmente, existe grande interesse na incorporação de genes específicos no genoma da 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 relacionados ao manejo das sementes.

O tegumento é considerado um dos principais condicionantes da germinação, vigor e da longevidade da semente de soja. Suas características físicas, químicas, morfológicas e anatômicas variam, bastante, entre variedades. Baseado nesses conhecimentos, a utilização de técnicas moleculares e estratégias para alteração e entendimento do controle genético do desenvolvimento do tegumento, propriedades e características, podem permitir a geração de constituições genéticas superiores, refletindo na qualidade da semente produzida.

O acompanhamento da formação do tegumento das sementes de soja em genótipos contrastantes para o caráter, associado com a análise dos mesmos, por meio da caracterização de contrastes de tecidos do tegumento e de suas células, bem como, geração de bancos de cDNAs armazenadores de genes envolvidos com os referidos contrastes, permitirá avançar nos estudos e produzir informações necessários para a realização de novos projetos de pesquisa.

O presente estudo teve como objetivo identificar características estruturais contrastantes, obter cDNA e desenhar *primers* relacionados à síntese de lignina e deposição de cera em tegumentos de sementes de soja de genótipos contrastantes em relação à permeabilidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Soja

A área de cultivo de soja no ano de 2007, no Brasil, foi de 20,6 milhões de hectares, 7,1% (1,59 milhão de hectares), inferior à safra anterior, que foi de 22,23 milhões de hectares. Apesar da redução na área cultivada, as boas condições climáticas favoreceram as lavouras elevando a produtividade média do País, de 2.403 kg ha⁻¹ para 2.788 kg ha⁻¹. Houve um incremento de 16,0%, aumentando a produção de 53,4 milhões de toneladas para 57,6 milhões de toneladas, 7,7% superior à da safra anterior. Das 57,6 milhões de toneladas, a região Centro-Oeste produziu 45,9% (26,4 milhões de toneladas), seguido pela Sul com 38,3% (22,0 milhões de toneladas), pela Sudeste com 7,1% (4,1 milhões de toneladas), pela Nordeste com 6,7% (3,9 milhões de toneladas, e, pela região Norte com 2,0% (1,2 milhões de toneladas) (CONAB, 2007).

A utilização de sementes de boa qualidade, relacionada aos atributos físicos, fisiológicos, sanitários e genéticos, é fundamental para garantir o sucesso da produção (KRYZANOWSKI, 1998).

A qualidade das sementes pode ser afetada por diversos fatores durante todo o processo de produção, iniciando pelos fatores genéticos que interferem no vigor e na 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 mesmas podem ser relacionados às características do tegumento das sementes. A longevidade e o potencial de deterioração no campo têm sido relacionados ao grau de permeabilidade do tegumento, assim como a suscetibilidade a danos mecânicos está associado ao teor de lignina (SOUZA e MARCOS FILHO, 2001).

2.2. Estrutura e características do tegumento das sementes de soja

A estrutura e composição do tegumento variam muito entre as sementes, constituindo elementos importantes para a identificação de espécies e variedades (TOLEDO e MARCOS FILHO, 1977).

As sementes de soja podem ser classificadas como de tegumento permeável ou semipermeável à água. Sementes com tegumento permeável embebem água facilmente, enquanto que as sementes com tegumento semipermeável podem permanecer longo tempo sem absorver água. As sementes semipermeáveis são comumente referidas como duras, sendo um tipo de dormência imposta pelo tegumento (MA et al., 2004). A ocorrência de tegumentos com elevada restrição à entrada de água é um dos fatores importantes no retardamento da germinação das sementes, não apenas de *Fabaceae* como de outras angiospermas. Nesse contexto a presença de camadas cuticulares nas sementes possui interesse especial (ESAU, 1993).

Algumas cultivares de soja e de outras espécies da família *Fabaceae* possuem sementes duras. As sementes duras podem proteger contra a deterioração e melhorar as qualidades agronômicas sob certas condições (MA et al., 2004).

Diversos atributos da soja podem contribuir para melhorar a qualidade das sementes, tais como, propriedades do tegumento, permeabilidade da vagem, resistência a fungos, tamanho da semente e permeabilidade da membrana celular (FRANÇA NETO, 1994).

O tegumento da semente de soja é constituído pela epiderme, que é formada pela cutícula e células paliçádicas, hipoderme, formada pelos osteoesclerídeos, e células parenquimatosas. As células paliçádicas 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. (PESKE e PEREIRA, 1983).

A camada paliçádica despertou muita atenção pelo fato de sua estrutura, em certas sementes leguminosas duras, ser tida como causadora do alto grau de impermeabilidade, afetando a capacidade de germinação. A chamada linha lúcida das células paliçádicas é considerada como região impermeável (ESAU, 1993).

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 o tegumento semipermeável é mecanicamente forte, não sofrendo rachaduras em condições normais.

O tegumento impermeável é uma característica muito importante no que diz respeito à deterioração de campo, pois ao causar uma redução na absorção de água pelas sementes, estas podem superar melhor as condições adversas (PESKE e PEREIRA, 1983).

Em soja, a permeabilidade do tegumento também está associada à porosidade, cor e cerosidade, que, entre outros fatores, influenciam o potencial de armazenamento, o grau de resistência ao enrugamento, à infecção por microorganismos e aos danos por embebição, o que tem reflexo direto sobre o vigor (SOUZA e MARCOS FILHO, 2001).

Sementes de soja com tegumento escuro embebem água a uma velocidade menor comparativamente com as de coloração clara. Maiores concentrações de lignina estão relacionados a genótipos de soja com tegumentos de menor permeabilidade, como as sementes de tegumento preto, o que foi relatado por PESKE e PEREIRA (1983), BRACCINI et al. (1994), ALVAREZ et al. (1997), COSTA et al. (2002), e SANTOS et al. (2007).

O tegumento é o principal modulador das interações entre as estruturas internas das sementes e o ambiente externo, tendo como principais funções: preservação da integridade das partes internas, proteção do embrião e tecidos de reserva contra danos mecânicos, barreira a entrada de microorganismos e insetos, regulação das trocas gasosas entre a semente e o meio e controle da velocidade de hidratação da semente (PESKE e PEREIRA, 1983, POPINIGIS, 1985, CARVALHO e NAKAGAWA, 1988 e SOUZA e MARCOS-FILHO, 2001).

A integridade do tegumento é extremamente importante para a proteção da semente contra injúrias durante a hidratação. Assim, têm sido relatadas diferenças na viabilidade e no vigor, associadas à pigmentação do tegumento, com maior sensibilidade das claras e opacas. Essa maior proteção verificada nas coloridas e brilhantes é devida à composição química do tegumento, sendo atribuída aos teores de lignina, cutina e suberina (MARCOS FILHO, 2005).

A absorção de água pela semente, ainda no campo, após a maturidade fisiológica, é uma das principais causas do decréscimo do potencial fisiológico (VIEIRA et al, 1982). Este fato, que despertou grande interesse na utilização de sementes que possuam tegumento semipermeável à água, característica que confere vantagens durante o processo de produção das sementes (CALERO et al., 1981; GIGLIOLI e FRANÇA NETO, 1982; PESKE e PEREIRA, 1983; SOUZA e MARCOS-FILHO, 2001).

2.3. Lignina e Elongase

As células vegetais apresentam dois tipos de parede: primária e secundária. As paredes celulares primárias são tipicamente finas (menos de 1µm), caracterizando células jovens e em crescimento. As paredes celulares secundárias, mais espessas e resistentes que as primárias, são depositadas quando a maior parte do crescimento está concluído. As paredes secundárias devem sua resistência e rigidez à lignina (TAIZ e ZEIGER, 2004).

O processo de lignificação ocorre pela biossíntese das ligninas que são constituintes da parede celular secundária de vegetais superiores, representando o segundo mais abundante biopolímero do planeta, sendo superadas, apenas, pela celulose. A lignina é um polímero de grupos fenilpropanóides, altamente ramificado, de estrutura ainda pouco conhecida e que está covalentemente ligada à celulose e a outros polissacarídeos da parede celular (TAIZ e ZEIGER, 2004; ENDT et al., 2005).

Outra classe de compostos estruturais importantes encontrados em paredes celulares vegetais são os lipídeos. Dentre esses a cutina e suberina destacam-se, formando uma matriz, onde as ceras encontram-se imersas. Ceras são compostos lipídicos formados por longas cadeias carbônicas e que, combinadas à cutina ou a suberina, formam camadas de barreiras preventivas à perda de água e de outras

moléculas pelas superfícies vegetais, sendo os lipídeos considerados os mais repelentes à água (RAVEN et al., 2001).

Uma molécula de lipídeo é constituída, basicamente, por três unidades de ácidos graxos, unidas a uma molécula de glicerol, cada classe de lipídeo tem uma composição distinta de ácidos graxos. Geralmente a síntese de ácidos graxos resulta em cadeias de 16 a 18 carbonos. No entanto, as plantas requerem ácidos graxos de cadeias mais longas. Todas as plantas produzem ceras, usualmente derivadas de ácidos graxos com cadeias de 26 a 32 carbonos. As plantas e a maioria dos organismos eucarióticos possuem um sistema elongase, especializado na extensão de ácidos graxos com mais de 18 carbonos na cadeia. Acredita-se que a elongação dos ácidos graxos ocorre em um processo de quatro etapas, que envolvem uma condensação, duas reduções e uma desidratação. Esse sistema de elongação depende de no mínimo quatro diferentes enzimas, 3- cetoacil-CoA sintase (KCS), 3- cetoacil-CoA redutase (KR), 3- hidroxiaçil-CoA desidratase (DH) e enoil-CoA redutase (ER). Assume-se que a primeira enzima desta seqüência determina a especificidade do substrato do sistema da elongase, bem como a extensão da alongação do ácido graxo (BUCHANAN et al., 2005).

Na soja, sementes com tegumentos considerados semipermeáveis estão associados a altas concentrações de lignina nas paredes celulares, o que confere resistência física ao tegumento das sementes de soja (TAVAREZ et al., 1987; PANOBIANCO et al., 1999, SANTOS et al. , 2007)

As ceras, lipídeos extremamente hidrofóbicos, gerados pelas elongases, que possuem a função de alongamento das cadeias carbonadas dos ácidos graxos, também conferem maior resistência ao tegumento (RAVEN et al. 2001; TAIZ e ZEIGER, 2004), principalmente à entrada de água.

2.4. Biologia Molecular na Ciência e Tecnologia de Sementes

A semente é a principal responsável pela transferência de inovações tecnológicas e dos ganhos genéticos resultantes dos trabalhos de melhoramento, seja ele tradicional ou resultado da engenharia genética, até o campo. A qualidade das sementes, definida como sendo o somatório de todos os atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários, é um dos principais fatores na determinação do sucesso de uma cultura (MARCOS FILHO, 2005; CARVALHO e NAKAGAWA,

2000). A tecnologia de sementes tem um papel importante no sistema de produção de sementes, por assegurar que estas possuam alta qualidade no que diz respeito a todos os níveis dos atributos da qualidade da semente (KRZYZANOWSKI, 1998).

Em soja, esses atributos, são em grande parte, reflexos das funções do tegumento da semente (SILVA, 2003). De acordo com SOUZA (2001), a utilização de estratégias moleculares para o entendimento e alteração do controle genético relacionado ao desenvolvimento, propriedades e características do tegumento das sementes depende da clonagem de genes específicos do tegumento, porém poucas atitudes significativas têm sido tomadas nesta direção.

Estima-se que a soja tenha aproximadamente 40.000 genes ¹. Estes são expressos ou não, nas diferentes fases de desenvolvimento e/ou em resposta aos diferentes estímulos e estresses a que essas plantas estiverem expostas, durante seu ciclo de vida. Compreender as peculiaridades da expressão gênica, quais suas interações com outros genes e como são regulados pelo ambiente, são os principais objetivos da genômica funcional (NEPOMUCENO et al., 2002).

A genômica estrutural tem como objetivo o estudo das estruturas dos genomas, onde o DNA é utilizado como matéria prima para a construção de bibliotecas genômicas. Na genômica funcional, é utilizado o RNA mensageiro (mRNA) para a construção de bibliotecas de DNA complementar (cDNA) (CHAVES, 2006).

O DNA complementar é sintetizado a partir de RNA mensageiro, com auxílio de uma enzima denominada transcriptase reversa. Usando RNA mensageiro como molde, a transcriptase reversa catalisa, por transcrição reversa, a síntese de uma única fita de cDNA. Através da ação da enzima DNA polimerase, o DNA fita simples é convertido em fita dupla. Devido ao cDNA ser sintetizado a partir do RNA mensageiro, ele não possui íntrons; isto significa que ao contrário do DNA genômico, o cDNA de eucariotos conterá apenas seqüências que codificam para proteínas (RAVEN et al. 2001).

Seqüências completas de nucleotídios do genoma de diversos organismos já são conhecidos. Um desafio maior será a identificação de todos os genes individuais e as funções das proteínas codificadas por esses genes. Várias técnicas estão

¹ Zimmer, P.D. – comunicação pessoal.

sendo utilizadas para relacionar as seqüências de DNA com o produto protéico apropriado (RAVEN et al. 2001).

As ferramentas biotecnológicas atualmente disponíveis, como o emprego de marcadores moleculares, tem papel fundamental no auxílio a programas de melhoramento para o desenvolvimento de variedades com elevada produtividade, adaptadas a diversos ambientes, resistentes a doenças, entre outras características que agregam valor econômico às culturas (MARCELINO et al, 2007).

Os marcadores moleculares de DNA podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação do DNA via reação em cadeia da DNA polimerase (PCR). Os marcadores baseados na reação de PCR são os mais utilizados e se baseiam na amplificação de fragmentos específicos de DNA, delimitados por iniciadores (*primers*), utilizando a enzima DNA polimerase. Os *primers* são pequenos fragmentos de DNA, contendo de 10 a 30 nucleotídios, e servem como ponto de referência para a enzima DNA polimerase copiar o DNA. A posição dos *primers* define a seqüência do DNA a ser copiada e o resultado obtido é a amplificação de um determinado fragmento do DNA em milhões de cópias, caso este esteja presente no genoma do indivíduo (MARCELINO et al., 2007).

Os recentes avanços, na biologia molecular e na bioinformática, têm permitido que possam ser analisados centenas ou milhares de genes expressos em um mesmo momento, permitindo identificar genes que são ativados, inativados, ou que têm seu nível de expressão regulado para mais ou para menos (up regulation; down regulation) em função de fatores bióticos ou abióticos. Entre as metodologias que mais se destacam hoje estão a Apresentação Diferenciada em gel (*Differential Display - DD*), Macro arranjos de DNA (*DNA Macroarrays*), Análise Seriada de Expressão Gênica (*SAGE - Serial analysis of gene expression*) e Micro arranjos de DNA (*DNA Microarrays*). Todas as técnicas tem seus pontos positivos e negativos, levando-se em conta vários fatores, que incluem os custos de implementação, as dificuldades de otimização e reprodutibilidade dos procedimentos laboratoriais e o volume de dados gerados (NEPOMUCENO et al., 2002).

A pesquisa na área de Biologia Molecular tem evoluído rapidamente e novas técnicas tem se mostrado úteis na obtenção de classes distintas de marcadores moleculares, que auxiliam na elucidação dos fatores que afetam a qualidade, na manipulação e identificação do material genético, assim como na preservação

desses materiais. Tais técnicas permitem monitoramento durante todo o processo produtivo, eliminando custos e garantindo qualidade (CARVALHO et al., 2005).

A utilização da biotecnologia com as aplicações das ciências genômicas e das ferramentas da bioinformática são de grande importância, pois estas tecnologias têm revolucionado profundamente as perspectivas e a velocidade de utilização do conhecimento biológico na obtenção de cultivares mais adaptadas e mais produtivas (MARCELINO, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para alcançar os objetivos propostos foram adotadas as estratégias: 1) microscopia eletrônica em cortes do tegumento; 2) produção de uma biblioteca de cDNAs de genes expressos durante a formação do tegumento da soja; e, 3) identificação de rotas metabólicas para desenho de *primers*, capazes de serem utilizados em estudos de expressão diferencial.

Foram utilizadas sementes de soja dos genótipos CD 202 e IAC Santa Maria 702 safra 2003/2004, cedidos pela COODETEC- Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola. Estes genótipos foram escolhidos por apresentarem características contrastantes em relação à permeabilidade do tegumento. O genótipo CD 202 permeável, com grande suscetibilidade a deterioração, e o genótipo IAC Santa Maria 702 semipermeável, apresentando tegumento duro, sendo necessário escarificação mecânica como método de superação da dormência.

Antes da semeadura do genótipo IAC Santa Maria 702 foi feita a escarificação manual das sementes com o auxílio de lixa, sendo as sementes escarificadas na região oposta ao hilo.

3.1. Cultivo de sementes de soja para obtenção de tegumentos em estádios distintos de desenvolvimento

O material vegetal foi cultivado em casa de vegetação, cedidas pela EMBRAPA EETB-CPACT, Pelotas.

As sementeiras foram realizadas em três épocas diferentes: 1ª época na segunda quinzena de novembro de 2004, 2ª época, na primeira quinzena de dezembro de 2004 e 3ª época, na segunda quinzena de dezembro de 2004. Para a sementeira, foram utilizados baldes, contendo solo, ao qual foi adicionado adubo químico, formulação 5:20:20, na dose recomendada para a cultura, sendo colocadas 4 sementes por balde, com quatro repetições por genótipo em cada época de sementeira. Esses foram colocados em casa de vegetação sem controle de temperatura, e regados, regularmente, sempre que necessário.

A partir da primeira floração das plantas, que ocorreu em torno de 45 dias após a sementeira para o genótipo CD 202, e 70 a 90 dias para o genótipo IAC Santa Maria 702, as flores foram marcadas com linhas de cores diferentes a cada dois dias, até a última floração das plantas (Figura 1). Esta prática permitiu que fosse identificado o tempo exato de desenvolvimento de cada legume. Os legumes com 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 dias de desenvolvimento, figura 2, foram coletados e acondicionados em caixas de isopor com gelo. Em seguida foram transportados até o laboratório para a extração dos tegumentos das sementes.



Figura 1. Detalhes do cultivo da soja em casa de vegetação. No detalhe é possível observar a marcação das flores para posterior coleta dos legumes.



Figura 2. Legumes contendo sementes nos estádios compreendidos entre 25 e 60 dias de desenvolvimento dos genótipos CD 202 (A e B) e IAC Santa Maria 702 (C e D).

3.2. Microscopia Eletrônica dos tegumentos de soja em diferentes estádios de desenvolvimento.

Os legumes foram colhidos aos 25, 40, 55 e 70 dias de desenvolvimento nos dois genótipos. No Laboratório de Imunologia e Microscopia Eletrônica da EMBRAPA Clima Temperado, foram realizados cortes transversais, na região oposta ao hilo, com 1000 nm de espessura, a uma velocidade de $4\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$, empregando o ultramicrotomo “Leica”. Posteriormente, os cortes foram corados com azul de metileno 1% e bórax 1%. As imagens foram obtidas em microscópio ótico Olympus BX 51, com aumento de 40x, e, o tamanho das diferentes células observadas nos tegumentos medidas com o auxílio do programa de computação Image-pro-plus.

Nas imagens obtidas foram avaliadas as diferenças estruturais, tamanho e espessura das células visualizadas, buscando observar diferenças entre genótipos e dentro de cada genótipo, nos diferentes estádios de desenvolvimento do tegumento.

3.3. Análise molecular

A estratégia para análise molecular consistiu na obtenção de tecidos vegetais, extração e purificação de RNA, seguido da obtenção do cDNA. Em paralelo foi realizada análise, *in silico*, para desenho de *primers* específicos de alguns genes envolvidos na rota metabólica da lignina e na deposição de cera nas sementes.

3.3.1. Obtenção dos tegumentos para extração do RNA total

O procedimento de extração e o armazenamento dos tegumentos foram realizados no Laboratório de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial/FAEM/UFPel.

A extração dos tegumentos foi realizada com auxílio de pinças esterilizadas e bisturi, sendo todo o processo executado em ambiente asséptico e livre de RNAses; utilizando luvas para evitar a contaminação do material com RNAs externos. Os tegumentos extraídos foram colocados em tubos esterilizados e devidamente identificados de acordo com o estágio de desenvolvimento e genótipo, logo após foram armazenados em ultra freezer com temperatura de -70°C , até a extração do RNA total (Figura 3).

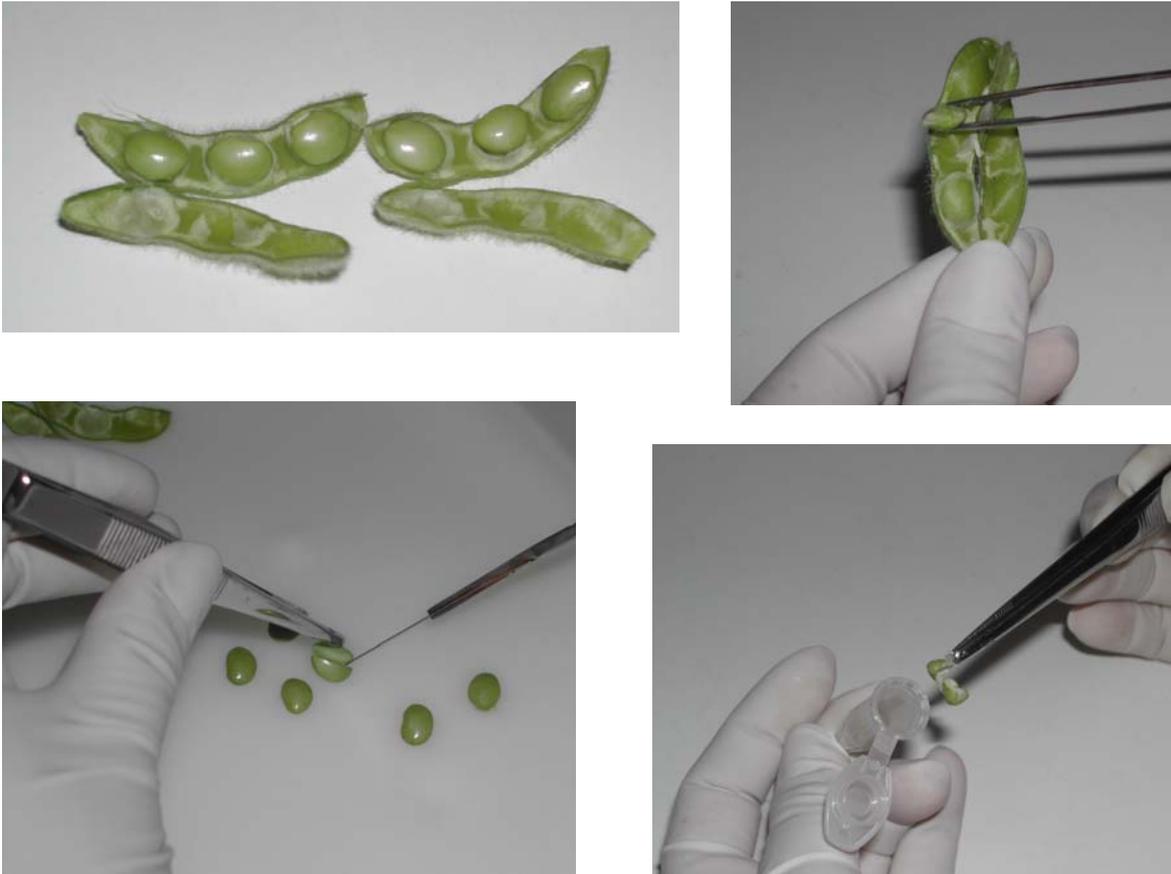


Figura 3. Detalhes dos legumes de soja contendo as sementes, da extração dos tegumentos e do acondicionamento destes em eppendorf.

3.3.2. Extração do RNA Total

Todos os procedimentos que envolveram a obtenção e posterior manipulação do RNA total, foram executados em ambiente asséptico, em câmara de fluxo laminar e/ou capela de exaustão, utilizando-se sempre vidrarias e material autoclavado, tratados com água ultra pura com DEPC (Dietil Pirocarbonato).

Para a extração do RNA total foram realizados testes preliminares utilizando dois protocolos: Trizol[®] Reagent e Protocolo com cloreto de lítio modificado (CHANG et al., 1993), com a finalidade de verificar qual dos protocolos seria mais eficiente na obtenção do RNA total dos genótipos em estudo, visto que a qualidade do RNA obtida em projetos de expressão diferencial de genes é um dos fatores mais críticos para a obtenção de sucesso.

Os tegumentos provenientes de cada genótipo e de cada estágio de desenvolvimento foram extraídos e armazenados separadamente.

3.3.3. Quantificação do RNA total

O RNA total extraído através dos métodos citados anteriormente, foi quantificado em gel de agarose 1%, preparado com tampão SB 1x, em sistema de eletroforese horizontal.

Em cada *slot* do gel de agarose, foram aplicadas, amostras de 10 µL de RNA total e 10 µL de tampão de carga *blue juice*. Para a visualização do RNA no gel de agarose foi utilizada a coloração com brometo de etídio, que permite visualização quando submetido à radiação ultravioleta no transluminador. Logo após a separação eletroforética o gel foi fotografado em meio digital. A partir dessa etapa, todos os procedimentos adotados utilizaram somente RNA proveniente da extração com cloreto de lítio modificado (CHANG et al., 1993).

Após a quantificação do RNA total, as diferentes amostras, correspondentes aos distintos estágios de desenvolvimento do tegumento, de cada genótipo, foram juntas equimolarmente, formando uma única amostra de trabalho (*bulk*).

3.3.4. Purificação do RNA mensageiro

O *bulk* de RNA total dos dois genótipos foi purificado utilizando o kit *FastTrack® 2.0* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante, obtendo-se então, duas amostras de RNAm para síntese de cDNA.

Após a purificação, foi determinado o rendimento do RNAm. A amostra foi diluída 100x, colocando 4 µL de amostra para 396 µL do tampão de eluição do kit (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, água tratada com DEPC). O tampão de eluição foi utilizado como branco na leitura do espectrofotômetro. A amostra foi diluída em cubeta de quartzo de 500 µL e a absorbância foi lida a 260 nm. A concentração de RNAm presente foi determinada usando a fórmula: $[RNAm] = (a_{260})(0,04 \mu\text{g}/\mu\text{L}) D$, onde, D é o fator de diluição (D= 100). O rendimento do RNA foi determinado pelo produto concentração x volume de RNA. A a_{260} deve ser > 0,05 para atingir-se boa

concentração de RNAm, segundo recomendações do kit *FastTrack® 2.0* (Invitrogen).

3.3.5. Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o *kit SuperScript™ Plasmid System with Gateway®* (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante, sendo realizados os procedimentos até a obtenção do cDNA ligado aos adaptadores *Sal I* e *Not I*.

O cDNA obtido foi eluído em 20 µL de água mili-Q e estocado a -20°C para utilização nos próximos projetos.

3.3.6. Construção dos *Primers*

Para a construção dos *primers*, inicialmente foi identificada uma rota metabólica chave na produção de compostos do tegumento da soja (Figura 4). A busca foi realizada no banco de dados *KEGG PATHWAY Database* (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). A rota que codifica para a lignina é denominada neste banco de dados como EGMA00940 – *Phenylpropanoid Biosynthesis* (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+egma00940) (Figura 4). Todas as seqüências que realizam algum passo nesta rota e foram analisadas e selecionadas as descritas como atuantes apenas nesta rota metabólica. As enzimas que se enquadraram nessa categoria (descritas como atuantes apenas na rota metabólica de síntese da lignina) foram: 4-cumarato-CoA ligase (EC 6.2.1.12), Cinamoil-CoA redutase (EC 1.2.1.44) e Cinamoil-álcool dehidrogenase (EC 1.1.1.195).

O banco de dados KEGG disponibiliza *contigs* formados pelo alinhamento de diversas ESTs (*Expressed Sequence Tags*), caracterizando dessa forma a seqüência completa do gene que codifica para a enzima em questão.

Para cada um dos genes de interesse foram desenhados *primers* em duas regiões. As características (TM- temperatura de anelamento e % GC) dos adaptadores utilizados na construção do cDNA (SAL e NOT), foram calculadas com o auxílio do programa *Gene Runner*, e os *primers* desenhados através da plataforma

3.3.7. Amplificação geométrica do cDNA CD 202 e IAC Santa Maria 702 com os *primers Sal I* e *Not I*.

Os cDNAs dos genótipos CD 202 e IAC Santa Maria 702, sintetizados a partir do *kit SuperScript™ Plasmid System with Gateway®* (Invitrogen) possuíam a característica de terem adaptadores com seqüências conhecidas nas extremidades, assim é possível multiplicar a quantidade de cDNA por meio da realização de amplificações unidirecionais, com a utilização dos *primers* construídos a partir dos adaptadores *Sal I* e *Not I*, conforme descrito abaixo. Esta estratégia foi utilizada com a finalidade de obter uma quantidade de cDNA suficiente para o desenvolvimento de novos projetos.

As reações de PCR Geométrica (unidirecional) foram realizadas em um volume final de 10 μ L contendo 20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl; 5 mM MgCl₂, 1 mM de cada dNTP; 1 pM de *primer*, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); e cDNA. As amplificações foram realizadas em termociclador (MJ Research, Inc.), segundo o programa descrito abaixo.

Programa PCR:

- 1- 3 minutos 94 °C
- 2- 45 segundos 94 °C
- 3- 45 segundos TM anelamento (de acordo com o *primer* utilizado)
- 4- 45 segundos 72 °C
- 5- 30 x volta ao passo 2
- 6- 10 minutos 72 °C
- 7- 4 °C até a retirada das amostras no termociclador.

As PCRs foram realizadas primeiramente utilizando o *primer Not I* nas reações, o produto destas foi usado como molde para amplificações posteriores com o *primer Sal I*.

3.3.8. Eletroforese em Gel de poliacrilamida

Os cDNA foram separados em gel de poliacrilamida 6%. Oito μ L de cDNA de cada genótipo foram aplicados por canaleta (*slot*). Após a eletroforese o gel foi corado com nitrato de prata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises comparativas da estrutura dos tegumentos CD 202 e IAC Santa Maria 702 por meio de microscopia eletrônica.

Por meio das imagens obtidas pela microscopia dos tegumentos de soja pode-se observar camadas de células: a epiderme (camada paliçádica), a hipoderme (osteoesclerídeos) e o parênquima (Figuras 5 e 6).

A camada paliçádica, constituinte da epiderme, apresenta as células paliçádicas ou macroesclerídeos alongadas perpendicularmente à superfície dos tegumentos e unisseriada nos dois genótipos analisados, como observado por ESAU (1993) em sementes de leguminosas.

Observa-se nas imagens obtidas dos tegumentos do genótipo IAC Santa Maria 702 (Figura 6) que a camada paliçádica da epiderme dos tegumentos analisados apresenta uma coloração mais intensa, o que não é observada no genótipo CD 202 (Figura 5).

subepidérmica (Figuras 5 e 6), contendo células com espaços intercelulares, conforme observado em estudos anteriores (PESKE e PEREIRA, 1983; ESAU, 1993 e SILVA, 2003).

Aos 25 dias de desenvolvimento dos tegumentos dos genótipos CD 202 e IAC Santa Maria 702 as células da camada hipodérmica estão próximas umas das outras e gradativamente durante o desenvolvimento, essas células distanciam-se, evidenciando grandes espaços intercelulares aos 70 dias de desenvolvimento, (Figuras 5 D e 6 D).

SILVA (2003) relatou em seus estudos com soja que a hipoderme dos tegumentos das sementes de soja analisadas possui espessura mais fina do que a da camada paliçádica, resultado este que difere no presente trabalho, onde foi observada espessura maior da camada hipodérmica dos tegumentos dos genótipos CD 202 e IAC Santa Maria 702, em relação a camada paliçádica (Figuras 5 e 6).

Medições das células das camadas dos tegumentos estudados mostram que houve um aumento do tamanho dos osteoesclerídeos aos 40 dias de desenvolvimento e, posteriormente, uma redução no tamanho destas células aos 55 e 70 dias de desenvolvimento (Figuras 5 e 6).

O parênquima abaixo da hipoderme apresentou células alongadas tangencialmente na parte externa e células menores na interna, conforme descrito em estudo anterior (ESAU, 1974). PESKE e PEREIRA (1983), ressaltam que o parênquima constitui-se de camada pluricelular, com 6 a 8 camadas de células parenquimatosas, enquanto SILVA (2003) observa que o parênquima é lacunoso, formando uma camada celular amorfa. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com as afirmações relatadas anteriormente.

4.2 Geração dos cDNAs

4.2.1 Obtenção do RNA total, RNA mensageiro e cDNA

Dentre os protocolos utilizados para a extração do RNA total de tegumentos de sementes de soja, o Trizol[®] Reagent (Invitrogen) foi eficiente somente para o genótipo CD 202 (Figuras 7 e 8). Por outro lado, o protocolo com cloreto de lítio modificado (CHANG et al., 1993) teve êxito para ambos os genótipos estudados.

O Trizol[®] Reagent é um produto 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. Entretanto, esse método, foi eficiente apenas para extração de RNA dos tegumentos provenientes do genótipo CD 202, para o genótipo IAC Santa Maria 702 esse protocolo não funcionou adequadamente (Figura 7).

A dificuldade de extrair RNA de alguns tecidos pode ser explicada por estudos realizados por TOOD e VODKIM (1993), os quais demonstram que proteínas e RNA de sementes com tegumento preto são difíceis de serem extraídos. Pois, a presença de pró-antocianinas e antocianinas em tegumentos de sementes de soja de coloração preta ou marrom, interage com RNA formando um complexo que altera o espectro de absorbância, a migração do RNA e a capacidade de hibridização do RNA com DNA.

Um outro fator, que dificulta a obtenção de um RNA total de boa qualidade, é a presença de compostos fenólicos no material vegetal. Esses compostos estão presentes em todos os vegetais e compreendem um grupo heterogêneo de substâncias. Os compostos fenólicos causam oxidação no produto final da extração de DNA ou RNA, de forma irreversível, tornando-o inviável para posterior uso nas técnicas de biologia molecular, fato este constatado também por Lima (2007) ao trabalhar com folhas de algodão.

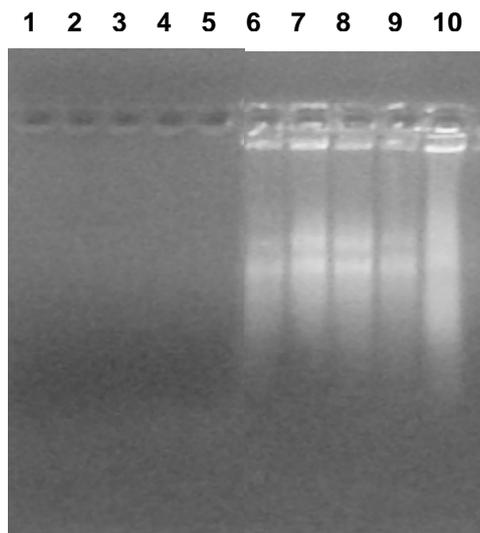


Figura 7. Gel de agarose com amostras de RNA total obtido de tegumentos do genótipo IAC Santa Maria 702 (canaletas 1 a 5) e genótipo CD 202 (canaletas 6 a 10) por meio do protocolo de extração Trizol[®] Reagent.

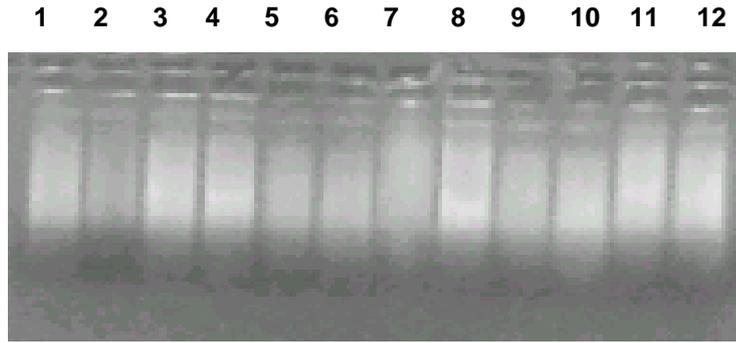


Figura 8. Gel de agarose com amostras de RNA total obtido de tegumentos do genótipo IAC Santa Maria 702 (canaletas 1 a 6) e genótipo CD 202 (canaletas 7 a 12) por meio do protocolo de extração contendo cloreto de lítio, modificado por CHANG et al. (1993).

O RNA mensageiro, para ambos os genótipos estudados, foi purificado utilizando o kit *FastTrack*[®] 2.0 (Invitrogen), a absorvância do RNAm obtido do genótipo CD 202 foi de 0,075 e do genótipo IAC Santa Maria 702 de 0,05, correspondendo a concentrações de 0,3 e 0,2 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, respectivamente.

A figura 9 mostra o gel de poliácridamida contendo cDNA de tegumentos dos genótipos CD 202 e IAC Santa Maria 702 obtidos á partir do *kit SuperScript*[™] *Plasmid System with Gateway*[®] (Invitrogen).

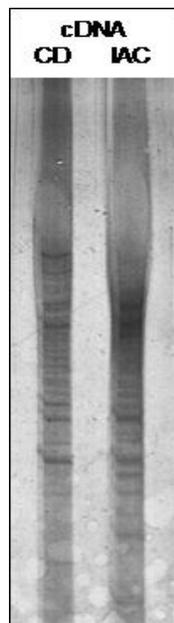


Figura 9. Gel de poliácridamida 6% contendo cDNA obtido dos tegumentos dos genótipos CD 202 e IAC Santa Maria 702 a partir de RNA total extraído através do método de cloreto de lítio, modificado por CHANG et al. (1993) e purificado com o kit *FastTrack*[®] 2.0 (Invitrogen).

Para cada μL de cDNA inicial de cada genótipo, utilizado na etapa de PCR unidirecional, foi obtido no final da amplificação 100 μL de cDNA de cada um dos genótipos. O resultado demonstra a eficiência da estratégia utilizada, pois foi possível obter cDNA em quantidade e qualidade considerável. Pressuposto necessário para estudos em nível de expressão diferencial de genes.

4.3. Desenho dos *primers*

A metodologia utilizada para desenho de *primers* possibilitou a obtenção de iniciadores com características similares aos adaptadores utilizados na construção do cDNA (Tabela 1).

Especificamente para o gene da Elongase, conforme relatado na metodologia, foi realizado um alinhamento entre duas seqüências depositadas no NCBI (GI 17153492 e GI11412251), utilizando-se as regiões conservadas para o desenho do *primer* (Figura 10). Para os genes da lignina o desenho do *primer* partiu diretamente da seqüência presente no banco de dados KEGG onde foi identificada a rota metabólica para a síntese da lignina.

O *primer* complementar ao adaptador *Sal I*, que possui tamanho de 12 pares de bases, foi desenhado considerando uma *TM* de 54°C, enquanto o *primer* complementar ao adaptador *Not I*, que possui 21 pares de bases, foi desenhado considerando uma *TM* de 64°C. Para cada um dos genes estudados foi gerado um par de *primer* com características compatíveis aos *primers* dos adaptadores utilizados. Totalizando oito conjuntos de *primers*, dois conjuntos para cada gene estudado, um com características compatíveis ao adaptador *Sal I* e outro com características compatíveis ao adaptador *Not I*. Como pode ser visto na tabela 1, os *primers* compatíveis com o adaptador *Sal I* mantiveram o tamanho de 14 pares de bases e *TM* variando de 42 a 54°C. No entanto, os *primers* compatíveis com o adaptador *Not I* o tamanho foi mantido em 21 pares de bases e a *TM* variou de 60 a 68°C. A amplitude da variação da *TM* foi devido à variação das características das seqüências moldes utilizadas na análise.

Tabela 1. Características dos *primers* desenhados que serão utilizados em estudos futuros buscando contrastes genotípicos nos tegumentos dos genótipos CD 202 e IAC Santa Maria 702

<i>Primer</i>	Orientação	Seqüência de nucleotídeos	TM (°C)	Origem
SAL I		GGGTGCGCAGGC	54	Adaptador SAL I
NOT I		TAGTTCTAGATCGCGAGCGGC	64	Adaptador NOT I
Elongase 1S	Forward	TGTCGCTGGTGAGG	50	Região conservada de ESTs
Elongase 1S	Reverse	GTGCCACTCGCTCA	50	Região conservada de ESTs
Elongase 1N	Forward	GCAGGGGAGGCGTTGAAAACA	68	Região conservada de ESTs
Elongase 1N	Reverse	CCCCGGCGTGTATGCAAAAAT	68	Região conservada de ESTs
Lignina 1S	Forward	GGAGCTCTGGCTCA	48	4-coumarate-CoA ligase
Lignina 1S	Reverse	CTGCTGGAGGAACC	48	4-coumarate-CoA ligase
Lignina 1N	Forward	TCCTTGAGGAGAGTCGAAGGT	64	4-coumarate-CoA ligase
Lignina 1N	Reverse	GGTTGATGTGGTTGCTTCTTCG	64	4-coumarate-CoA ligase
Lignina 2S	Forward	GGCAGGACCTCTCT	45	Cinnamoyl-CoA reductase
Lignina 2S	Reverse	GGGGTACAGACCAC	42	Cinnamoyl-CoA reductase
Lignina 2N	Forward	GTGTGTGTGACGGGTGCTTC	63	Cinnamoyl-CoA reductase
Lignina 2N	Reverse	CAGAGGTCCTGCCACCATAG	60	Cinnamoyl-CoA reductase
Lignina 3S	Forward	CGACGCTGGAACG	51	cinnamyl-alcohol dehydrogenase
Lignina 3S	Reverse	GAAACCCGGGTCAG	50	cinnamyl-alcohol dehydrogenase
Lignina 3N	Forward	GACCCCCAGGCTGAATTGTTAG	64	cinnamyl-alcohol dehydrogenase
Lignina 3N	Reverse	TACATCGGGAGTTCGAGGCTTT	64	cinnamyl-alcohol dehydrogenase

```

gi | 17153492 | gb | BM143425.1 | BM14 | -----GTTT 4
gi | 11412251 | gb | BF424262.1 | BF42 | AACTGCGTATACCAAAGGAGGACCAGAGCGGGAAAATAGGGGTGTGTTT 50
                                     ****

gi | 17153492 | gb | BM143425.1 | BM14 | GGCGAGGGAGTTGATGGCAGTGGCAGGGGAGGCGTTGAAAACAAACATAA 54
gi | 11412251 | gb | BF424262.1 | BF42 | GGCGAGGGAGTTGATGGCAGTGGCAGGGGAGGCGTTGAAAACAAACATAA 100
                                     ****

gi | 17153492 | gb | BM143425.1 | BM14 | CGACCTTGGGGCCGTGGTTCTGCCATATTCGGAGCAGGTGATGTTCTTG 104
gi | 11412251 | gb | BF424262.1 | BF42 | CGACCTTGGGGCCGTGGTTCTGCCATATTCGGAGCAGGTGATGTTCTTG 150
                                     ****

gi | 17153492 | gb | BM143425.1 | BM14 | GTGTCGCTGGTGGAGGGAAGGTGCTGAAGATGTCGGGGGTGAAGCCATA 154
gi | 11412251 | gb | BF424262.1 | BF42 | GTGTCGCTGGTGGAGGGAAGGTGCTGAAGATGTCGGGGGTGAAGCCATA 200
                                     ****

gi | 17153492 | gb | BM143425.1 | BM14 | CATTCCGGATTTCAGCTGGCCTTGGAGCATTTTGCATACACGCCGGGG 204
gi | 11412251 | gb | BF424262.1 | BF42 | CATTCCGGATTTCAGCTGGCCTTGGAGCATTTTGCATACACGCCGGGG 250
                                     ****

gi | 17153492 | gb | BM143425.1 | BM14 | GGAGAGCGGTGCTGGACGAGCTGCAGAAGAATCTTGAGCTGAGCGAGTGG 254
gi | 11412251 | gb | BF424262.1 | BF42 | GGAGAGCGGTGCTGGACGAGCTGCAGAAGAATCTTGAGCTGAGCGAGTGG 300
                                     ****

gi | 17153492 | gb | BM143425.1 | BM14 | CACATGGAGCCCTCCAGGATGACCCTGCACAGATTTCGGTAACACTTCCAG 304
gi | 11412251 | gb | BF424262.1 | BF42 | CACATGGAGCCCTCCAGGATGACCCTGCACAGATTTCGGTAACACTTCCAG 350
                                     ****

gi | 17153492 | gb | BM143425.1 | BM14 | CAGCTCCCTCTGGTACGAGCTGGCCTACACGGAGGCCAAGGGTCGGGTCT 354
gi | 11412251 | gb | BF424262.1 | BF42 | CAGCTCCCTCTGGTACGAGCTGGCCTACACGGAGGCCAAGGGTCGGGTCT 400
                                     ****

gi | 17153492 | gb | BM143425.1 | BM14 | CCAAGGGGATCGGGTCTGGCAGATCGCCTTCGGGTCGGGTTTCAAGTGT 404
gi | 11412251 | gb | BF424262.1 | BF42 | CCAATGGGGATCGGGTCTTGCAAAATCGCCTTTGGGTCGGGTTTCAAG--- 447
                                     **** *****

gi | 17153492 | gb | BM143425.1 | BM14 | AACAGCGCCGTCTGGAAGGCCGTTAGGGACATGCCATTCTTAAAGGACTG 454
gi | 11412251 | gb | BF424262.1 | BF42 | -----

gi | 17153492 | gb | BM143425.1 | BM14 | GCGTGGCAACCCTGNGATGACTCCATCAATAACTATCCCGTTTCACTTC 504
gi | 11412251 | gb | BF424262.1 | BF42 | -----

gi | 17153492 | gb | BM143425.1 | BM14 | CCTCCGCATCTTCTAATTAACCTATTAC 533
gi | 11412251 | gb | BF424262.1 | BF42 | -----

```

Figura 10. Alinhamento das ESTs GI 17153492 e GI 11412251 correspondentes ao gene que codifica para à elongase da soja. O * indica similaridade de nucleotídeos na posição, atingindo 88%. Os *primers* foram desenhados na região conservada.

6. CONCLUSÕES

O genótipo IAC Santa Maria 702 apresenta a camada paliçádica mais espessa que o genótipo CD 202 .

O protocolo a base de cloreto de lítio é eficiente para extrair RNA total de ambos os genótipos e em todas as fases de coleta.

A estratégia de multiplicação unidirecional do cDNA é eficaz para geração de uma quantidade suficiente para o desenvolvimento de estudos futuros de expressão diferencial de genes.

A análise *in silico* permite o desenvolvimento dos *primers* relacionados aos genes da lignina e da elongase.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BRACCINI, A. L.; REIS, M. S.; SEDYAMA, C. S.; SEDYAMA, T. Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária da semente de genótipos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.16, n.2, p.195-200, 1994.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists. 5 ed. Rockville, Maryland. Courier Companies, Inc., 2005.

CALERO, E.; WEST, S. H., HINSON, K. Water absorption of soybean seed and associated causal factors. **Crop Science**, Madison, v. 21, p. 926-933, 1981.

CARVALHO, M. L. M.; VIEIRA, M. G. G. C.; VON PINHO, E. R. Técnicas moleculares em sementes. Aplicação de técnicas moleculares no controle de qualidade das sementes. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v. , n. , p.44-47, 2005.

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

CARVALHO, N.M.; NACAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4^o edição, Jaboticabal: Funep, 2000. 588 p.

CHANG S.; PURYEAR J.; CAIRNEY J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens. v.11. n.1 p. 113-116. 1993

CHAVES, A. L. **Biologia Molecular para iniciantes**. 2^o edição, Pelotas: UFPel, 2006. 160 p.

COSTA, J. A.; PIRES, J. L. F.; THOMAS, A. L.; ALBERTON, M. Variedades de soja diferem na velocidade e capacidade de absorver água. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.3, n.1, p.91-96, 2002.

ENDT, D. V.; COSTA, P.; ZAGO, M. K.; ZANETTINI, M. H. B.; PASQUALI, G. Genes de Lignificação. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** - Encarte Especial. p.152-159, 2005.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. 12^o reimpressão. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 1993. 293p.

FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A.; KRYZANOWSKI, F. C. Seed production and technology for the tropics. In: EMBRAPA-CNPSO. **Tropical soybean: improvement and production**. Rome: FAO, 1994. p. 217-240

GIGLIOLI, J. L.; FRANÇA NETO, J. B. Efeito da escarificação mecânica e do retardamento de colheita sobre a emergência de sementes de soja com tegumento impermeável. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA NA SOJA. 2, 1981, Brasília. Anais..., Londrina:EMBRAPA-CNPSO, 1982, v. 1, p. 601-609.

KRYZANOWSKI, F. C. Relationship between seed technology research and federal plant breeding programs. **Scientia Agricola**. Piracicaba, n. 55, p. 83-87, 1998.

LIMA, M. M. A.; VIDAL, M. S.; LIMA, L. H. G. M.; MENESES, C. H. S. G.; SILVA, M. V. Extração de RNA Total de Folhas de Algodoeiro. **Circular técnica 113**. EMBRAPA, Campina Grande, PB, Outubro, 2007.

MA, F.; 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**, London, 2004.

MARCELINO, F.; BINNECK, E.; ABDELNOOR, R. V.; NEPOMUCENO, A. L. Ferramentas biotecnológicas aplicadas à cultura da soja. **Circular técnica 47**. EMBRAPA, Londrina, 2007.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **CONAB**, 2007. Capturado em julho de 2007. On-line. Disponível na Internet: <http://www.conab.gov.br/safras.asp>.

NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; ARRIAS, C. A.; OYA, T.; MARIN, S.; BINNECK, E.; LEMOS, N. G.; BRETON, Mi. C.; MARTINS, P. K.; PEDROSO, J. C.; DELATTRE, N. Identificação, clonagem e sequenciamento de genes diferencialmente expressos em resposta às variações climáticas em soja. **Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja**, Londrina, PR, v. 198, p. 20-22, 2002.

PANOBIANCO, M.; VIEIRA, R.D.; KRYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA NETO, J. B. Electrical conductivity of soybean seed and correlation with seed coat lignin content. **Seed Science Technology**, Zurich, v. 27, n. 3, p. 945-949, 1999.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília, AGIPLAN. 1985. 289 p.

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

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2001. 906 p.

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

SILVA, M. A. D. **Morfologia da testa e potencial fisiológico de sementes de soja**. 2003. 95f. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de Concentração em Produção e Tecnologia de Sementes) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

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

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

TAVAREZ, D. Q.; MIRANDA, M.A. C.; UMINO, C. Y.; DIAS, G. M. Características estruturais do tegumento de sementes de linhagens de soja permeável e impermeável. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 10, p. 147-153, 1987.

TOLEDO, F. F.; MARCOS FILHO, J. **Manual de sementes: tecnologia da produção**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 1977.

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

VIEIRA, R. D.; SEDIYAMA, T.; SILVA, R. F.; SEDIYAMA, C. S.; THIÉBAUT, J. T. Efeito do retardamento da colheita sobre a qualidade de sementes de soja cv. "UFV-2". **Revista Brasileira de Sementes**. Brasília, v. 4, n. 2, p. 9- 22, 1982.

ANEXOS

ANEXO 1 - Protocolo Trizol® Reagent para extração de RNA total

Autoclavar por 40 minutos todo material que será utilizado para extração.

Manipular o trizol em capela, ou utilizar máscara.

O material pode ser macerado em N líquido ou diretamente no Trizol.

Procedimentos:

1. Colocar 50-100 mg de tecido em tubo eppendorf de 1,5 mL
2. Colocar 700 μ L de Trizol resfriado a 4 °C
3. Macerar o material e deixar 5 minutos a temperatura ambiente
4. Colocar 140 μ L de clorofórmio
5. Homogeneizar manualmente, deixa a temperatura ambiente por 3 minutos
6. Centrifugar a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C
7. Coletar fase aquosa em eppendorf 1,5 mL
8. Adicionar 350 μ L de isopropanol
9. Manter a temperatura ambiente por 10 minutos
10. Centrifugar a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C
11. Remover o sobrenadante e adicionar 1 mL de etanol 75%
12. Homogeneizar e centrifugar a 7.500 g por 5 min. a 4 °C
13. Eliminar o sobrenadante e manter o precipitado por 5 min. a 35 °C, para acelerar a secagem
14. Ressuspender o precipitado em 50 μ L de água ultrapura, previamente tratada com DEPC 0,01% e autoclavada por 40 min. a 121 °C
15. Incubar por 10 minutos a 55-60 °C
16. Para a dosagem dos ácidos nucléicos diluir a amostra na proporção 1:300 em água ultra pura com DEPC.
17. Realizar leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm
18. A razão das amostras para serem utilizadas para a síntese de cDNA devem ficar entre 1,8 e 2,0.

Digestão com DNase I

Para eliminar DNA genômico das amostras de RNA total, realizar digestão com Deoxyribonuclease I Amplification Grade (Invitrogen). Utilizar 1 μ L de RNA total

para digestão. Executar a reação segundo recomendações do fabricante. Volume final da reação de 10 μL , destes 8 μL são adicionados a reação de síntese de cDNA.

ANEXO 2 - Protocolo para extração de RNA Total com cloreto de lítio modificado segundo, Chang et al. (1993).

Materiais:

1) Tampão CTAB

Substância	Concentração final	Quantidade para 500 ml
CTAB	2%	10 g
PVP (opcional) ¹	2%	10 g
EDTA	25 mM	25 ml de estoque a 0,5 M
NaCl	2 M	58,57 g
Tris-HCl (pH 8,0) ²	100 mM	50 ml de estoque a 1 M
Água DEPC 0,1% Tratada		Até 500 mL (ajustar após o Tris, vide abaixo)

1-Apenas para tecidos com compostos fenólicos (oxidantes).

2-Preparar o estoque e autoclavar, acrescentando-o apenas após autoclavar o tampão CTAB sem Tris.

3-Observações:

DEPC (mesmo tratado) reage com Tris-HCl durante a autoclavagem, por este motivo, só adicionar o Tris após o resfriamento do tampão autoclavado.

CTAB lisa a parede celular e as demais membranas.

Acrescentar 0,2 % de β -mercapto-etanol apenas em material foliar.

2) Clorofórmio/IAA, 24:1

3) Cloreto de Lítio 10 M (não autoclavar, preparar com água DEPC e manter na geladeira). Para 100 ml água DEPC tratada acrescente 42,39 g. Prepare com esterilidade (não pode autoclavar). Mantenha em geladeira (4 °C).

Observação: Cloreto de lítio precipita RNA. A maioria do DNA, os polisacarídeos e RNAs de baixo peso molecular (tRNA, etc.) serão removidos.

4) Etanol 70% (preparar direto com água DEPC em um falcon de 50 ml)

5) Água DEPC (Dietil-Pirocarbonato C₆H₁₀O₅, manter em geladeira) tratada:

Coloque 1 mL de DEPC em um litro de água livre de RNases. Deixe sob agitação na capela de fluxo 12 horas ou mais. Autoclave e deixe sob agitação

(agitador magnético) por 2 horas ou mais. Quando autoclavar já deixe a cápsula magnética dentro, para que também esteja estéril.

Observação: DEPC reage com resíduos de histidina presentes nas proteínas, inativando assim as RNAses. Por outro lado, também pode reagir com RNA. Por este motivo deve ser tratado com calor (através de autoclavagem) antes de ser usado. Com o calor DEPC se quebra em CO₂ e etanol, fazendo-se necessária a agitação para eliminar os produtos volatilizados.

6) Vidraria, cadinhos, pistilos, material plástico e espátulas esterilizados.

7) Bancada limpa e esterilizada com álcool 70% (comercial).

Precauções:

Para todos os procedimentos use água tratada com DEPC (item 5 acima).

Vidraria, cadinhos, pistilos, material plástico e espátulas esterilizadas.

Vidraria e plásticos podem ser tratados para remover RNAses da seguinte maneira:

-Vidraria e espátulas de metal podem ser colocadas em forno de esterilização a 180°C por no mínimo 8 horas.

-Material plástico novo (se já não for livre de RNAses) pode ser tratado de duas maneiras: mergulhe-os em 0,1 M NaOH/0,1 M EDTA "*over night*", enxaguando-os com água-DEPC, ou, mergulhe-os em H₂O₂ por 10 minutos e enxágüe-os com água DEPC.

O protocolo descrito por CHANG et al. (1993) preconiza a utilização de 10 gramas iniciais de tecido vegetal, já no presente trabalho foi utilizada 100 mg e conseqüentemente todos os outros reagentes necessários para este procedimento foram alterados proporcionalmente, conforme descrito abaixo:

Procedimentos para uma amostra de até 100 mg de tecido:

1. Pré-aquecer 400 µL de tampão CTAB a 65 °C
2. Tratar os cadinhos, pistilos e espátulas com álcool 70% e depois com acetona pura. Deixar evaporar.
3. Colocar o tecido (previamente pesado) no cadinho, acrescentar nitrogênio (N₂) líquido e proceder à sua desintegração com o pistilo até que se transforme em um pó fino.

4. Distribuir o material em dois tubos, acrescentar a cada um 400 μ L do tampão CTAB pré-aquecido e levar ao banho-maria ou termobloco a 65 °C por 45 minutos (até 1 h), agitar a cada 10 minutos.

Obs.: Este passo tem como finalidade promover a completa lise dos componentes celulares, liberando-os para as extrações que serão procedidas a seguir. Caso esteja trabalhando com folhas, pode acrescentar neste passo a cada tubo 4 μ l de 2-ME (Di-Mercaptoetanol), embora este procedimento não seja necessário para alguns grupos de vegetais.

5. Adicionar um volume (cerca de 500 μ L) de Clorofórmio/IAA. Deixar incubando à temperatura ambiente sob agitação por 10-15 minutos e centrifugar a 6.500 rpm por 10 minutos.

6. Transferir o sobrenadante para um novo tubo com 300 μ L de Clorofórmio/IAA, agitar por 2-5 minutos e centrifugar (6.800 rpm) por 10 minutos.

7. Transferir o sobrenadante para um tubo novo e estimar por comparação o volume de sobrenadante obtido.

8. Adicionar 1/3 a 1/4 do volume do sobrenadante de Cloreto de lítio a partir de um estoque a 10M.

9. Deixar precipitando overnight em gelo na geladeira (4 °C)

10. No dia seguinte centrifugar o tubo com o precipitado a 4 °C, 8.000 rpm por 45 minutos.

11. Retirar cuidadosamente (o pellet é muito gelatinoso e se desprende com facilidade) e emborcar o tubo uma única vez para observar o pellet. Remover o sobrenadante.

12. Lavar duas vezes (10 minutos cada) com álcool 70% (~100 μ L, feito com etanol p.A. e água DEPC), centrifugar após cada lavagem (4 °C, 8000 rpm, 10 minutos).

13. Deixar o pellet secando com o tubo inclinado sob uma folha de papel absorvente nova (o tempo depende do ambiente, entre 30-60 minutos).

14. Ressuspender em 25- 30 μ l de água DEPC tratada. Unir os eluídos em um eppendorf. Até o processamento, manter no freezer a -80 °C.

Correr um gel de agarose (1,5 %) para verificar a qualidade da extração (aconselhamos usar 2, 5 e 20 μ l).

O protocolo acima se preza à obtenção de quantidades consideráveis de RNA total (1 mg ou mais), adequado para purificação de quantidades consideráveis de cDNA tecido ou estágio-específico.

ANEXO 3 - Purificação do RNA mensageiro

O RNA mensageiro foi purificado através da utilização do kit *FastTrack® 2.0* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.

Preparo do tampão de lise:

1. Checar se o tampão estoque tem precipitado branco (SDS), se tiver aquecer 65 °C até dissolver. Deixar esfriar a T ambiente antes de adicionar o degradador proteína/RNase.
2. Adicionar 300 µL de degradador proteína/RNase para 15 mL de tampão estoque para cada extração (calcular para a quantidade a ser feita)
Utilizar imediatamente.

Isolamento do RNA mensageiro do RNA total (1,0 mg de RNA total):

1. Precipitar o RNA total em etanol 100% e lavar com etanol 80%
2. Ressuspender o pellet em 100 µL de tampão de eluição
3. Adicionar 10 mL de tampão de lise em tubo de centrífuga de 50 mL e adicionar a solução com o RNA
4. Aquecer a 65°C por 5 minutos, colocar imediatamente no gelo por 1 min.
5. Colocar o tubo a temperatura ambiente e adicionar 650 µL 5M de NaCl, misturar por inversão gentilmente
6. Adicionar o conteúdo do oligo (dT) celulose no lisado
7. Fechar o tubo e deixar o oligo (dT) celulose hidratar por 2 minutos. O oligo (dT) celulose deve dispersar rapidamente.
8. Agitar o tubo gentilmente a temperatura ambiente por 15 a 60 minutos. A agitação aumenta a eficiência da ligação do RNA m á oligo (dT) celulose.
9. Centrifugar o oligo (dT) celulose a 3000 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Remover o sobrenadante cuidadosamente da camada de resina.

Lavagem da oligo (dT) celulose:

1. Ressuspender a oligo (dT) celulose em 20 mL de tampão de ligação. Centrifugar 3000 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Remover o sobrenadante.
2. Ressuspender a resina em 10 mL de tampão de ligação. Centrifugar 3000 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Remover o sobrenadante.

3. Ressuspender a resina em 10 mL de tampão de lavagem low salt. Centrifugar 3000 g, por 5 minutos a temperatura ambiente. Este sal remove o SDS e contaminações com RNAs e rRNAs.
4. Repetir o passo anterior até o tampão não formar mais bolhas após centrifugação (2-4 vezes). Depois da última lavagem ressuspender a oligo (dT) celulose em tampão de lavagem low salt 800 μ L.
5. Transferir a oligo (dT) celulose para a coluna para o último passo de lavagem. Centrifugar 5000 g por 10 segundos a minutos a temperatura ambiente.
6. Remover a coluna do tubo de micro centrífuga e decantar o líquido dentro do tubo. Repetir os passos 5 e 6 (os dois passos anteriores) tantas vezes quanto necessários (2-3 vezes) para transferir a oligo (dT) para a coluna.
7. Para lavar colocar a coluna de volta no tubo, encher a coluna até o topo com tampão de lavagem low salt (500 μ L) e misturar o tampão com a camada de celulose, com a ponteira estéril c/ filtro. Centrifugar por 10 segundos. Cuidado quando misturar para não perder material.
8. Repetir o passo anterior \pm 3 vezes ou até a DO 260 da amostra ser menor que 0,05.

Eluição e precipitação do RNAm:

1. Colocar a coluna dentro de um novo tubo de micro centrífuga.
2. Adicionar 200 μ L de tampão de eluição e misturar o tampão na celulose com a ponteira da pipeta.
3. Centrifugar 30 segundos, mas não descartar o líquido. O RNA está agora no eluído.
4. Adicionar 200 μ L do tampão de eluição na coluna, misturar com a celulose e centrifugar 30 segundos.
5. Nos passos anteriores o RNAm ficará eluído no tubo.
6. Remover a coluna do tubo. O tubo contém 400 μ L. Não descartar, isso é sua amostra com o RNAm.
7. Precipitar o RNAm com 0,15 volume (\sim 60 μ L) de 2M acetato de sódio e 2,5 volume (1 mL) de etanol 100%. Congelar no gelo seco até solidificar.

8. Descongelar e centrifugar na micro centrífuga na velocidade máxima (16.000 g) por 15 minutos a 4 °C.

9. Remover o etanol. Centrifugar levemente e remover traços de etanol. Ressuspender o pellet de RNA em 20-50 μ L de tampão de eluição (10mM Tris, pH 7,5).

Determinar a concentração de RNAm (no espectrofotômetro). O RNAm pode ser usado imediatamente ou armazenado indefinidamente a -70 °C.

ANEXO 4 - Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada através da utilização do *kit SuperScript™ Plasmid System with Gateway®* (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante, sendo realizados os procedimentos até a obtenção do cDNA ligado aos adaptadores SAL e NOT.

Síntese da primeira fita

20 µL da reação é designada para converter 5 µg de mRNA na primeira fita do cDNA. A quantidade de Superscript™ RT adicionada a reação poderá ser dependente da quantidade inicial de RNAm. É recomendado 200 unidades de Superscript™ RT para ≤1 µg de RNAm, e 200 unidades/µg de RNAm para 1 a 5 µg de RNAm. Use 5µg de RNAm como material inicial para obtenção de 30 ng de cDNA.

1. Adicione 2 µL do *primer* para o adaptador NOT I em um micro tubo estéril. Foi adicionado 9 µL RNA m, diluído em água tratada com DEPC.
2. Aqueça a mistura a 70°C por 10 minutos, e congele. Colete o conteúdo do tubo por breve centrifugação e adicione 4 µL de tampão primeira fita 5X, 2 cL de DTT 0,1M, 1 µL de mix dntp 10 mM.
3. Misture os conteúdos do tubo gentilmente e coletar a reação por breve centrifugação. Coloque o tubo a 37°C por 2 min.
4. Adicionar 1 µL de Superscript™ II RT. Misture e incube por 1 hora.

Concentração final da reação:

50 mM Tris-HCl (pH 8,3)

75 mM KCl

3 mM MgCl₂

10 mM DTT

500 µM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP

50 µg/mL de adaptador Not I

≤5 µg (≤ 250 µg/mL) mRNA

10.000 – 50.000 unidades/mL de Superscript™ II RT

5. Colocar o tubo no gelo para terminar a reação

Síntese da segunda fita

1. Em banho de gelo, adicionar no tubo da reação da primeira fita:

- 93 μL de água DEPC
- 30 μL de tampão 5x de segunda fita
- 3 μL de mix dntp 10 mM
- 1 μL de DNA ligase de E. coli (10 unidades/ μL)
- 4 μL de DNA polimerase I E. coli (10 unidades/ μL)
- 1 μL de RNase H E. coli (2 unidades/ μL)

Volume Final de 150 μL

Composição final da reação:

- 25 mM Tris-HCl (pH 7,5)
- 100 mM KCl
- 5 mM MgCl_2
- 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 0,15 mM $\beta\text{-NAD}^+$
- 250 μL de cada dNTP
- 1,2 mM DTT
- 65 unidades/mL de DNA ligase
- 250 unidades/mL de DNA polimerase I
- 13 unidades/mL de RNase H

2. Misturar o tubo gentilmente e incubar por 2 horas a 16 °C

3. Adicionar 2 μL (10 unidades) de T4 DNA polimerase e continuar incubando a 16 °C por 5 minutos

4. Colocar no gelo e adicionar 10 μL de EDTA 0,5 M

5. Adicionar 150 μL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), vortexar e centrifugar a temperatura ambiente por 5 minutos a 14000 g. remover 140 μL da fase aquosa e transferir para novo tubo

6. Adicionar 70 μL de acetato de amônia 7,5 M, seguido de 0,5 mL de etanol absoluto a -20 °C. vortexar e centrifugar a temperatura ambiente por 20 minutos a 14000g

7. Remover o sobrenadante e lavar o pelet com 0,5 mL de etanol 70% a -20 °C. centrifugar por 2 minutos a 14000 g e remover o sobrenadante

8. Secar o cDNA A 37 °C por 10 minutos

Adição do Adaptador SAL

1. Em banho de gelo, adicionar os seguintes reagentes na ordem apresentada, ao cDNA anterior:

- 25 μ L de água DEPC
- 10 μ L de tampão T4 DNA ligase 5x
- 10 μ L do adaptador SAL I
- 5 μ L de T4 DNA ligase
- Volume final 50 μ L
- Composição final da reação:
- 50 Mm de Tris HCl pH7,6
- 10 μ L de MgCl
- 1 mM de ATP
- 5% (p/v) PEG 8000
- 1mM de DTT
- 200 μ g/mL de adaptador SAL I
- 100 unidades/mL de T4 DNA ligase

2. Misturar gentilmente e incubar a reação a 16 °C por 16 horas
3. Adicionar 50 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), vortexar e centrifugar a temperatura ambiente por 5 minutos, a 14000 g. Remover cuidadosamente 45 μ L da fase superior e transferir para novo tubo.
4. Adicionar 25 μ L de acetato de amônio 7,5 M, seguido de 150 μ L de etanol absoluto (-20 °C). Vortexar e centrifugar por 20 minutos a 14000 g.
5. Remover o sobrenadante e lavar o *pellet* com 0,5 mL de etanol 70% a -20 °C. Centrifugar por 2 minutos a 14 000 g e remover o sobrenadante.
6. Secar o cDNA a 37°C por 10 minutos para evaporar o etanol residual.

Digestão do NOT I

1. Adicionar os seguintes reagentes em banho de gelo, na ordem apresentada, ao cDNA:

- 41 μ L de água DEPC
- 5 μ L de tampão React 3
- 4 μ L de NOT 1

Volume final de 50 μ L

Composição final da reação:

50 mM de Tris HCl pH 8

10 mM de $MgCl_2$

100 mM de NaCl

1200 unidades/mL de NOT 1

2. Misturar gentilmente e incubar a reação por 2 h a 37°C.
3. Adicionar 50 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), vortexar e centrifugar a temperatura ambiente por 5 minutos, a 14000 g. Remover cuidadosamente 45 μ L da fase superior e transferir para novo tubo.
4. Adicionar 25 μ L de acetato de amônio 7,5 M, seguido de 150 μ L de etanol absoluto (-20 °C). Vortexar e centrifugar por 20 minutos a 14000 g.
5. Remover o sobrenadante e lavar o *pellet* com 0,5 mL de etanol 70% a -20 °C. Centrifugar por 2 minutos a 14000 g e remover o sobrenadante.
6. Secar o cDNA a 37°C por 10 minutos para evaporar o etanol residual.

O cDNA obtido pode ser eluído em 20 μ L de água milli-Q e estocado a -20 °C.

ANEXO 5 - Eletroforese em Gel de poliacrilamida

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida, em eletroforese vertical.

Protocolo utilizado para o preparo e revelação do gel de poliacrilamida:

Preparo do gel de poliacrilamida:

1. Lavar a placa com detergente
2. Passar etanol 705
3. Tratar a placa maior com Bind silane (1 mL) e depois passar papel toalha para retirar a oleosidade
4. Tratar a placa menor com Repel silane (1 mL)
5. Preparar a solução de gel e colocar o APS e o Temed somente no momento de aplicar o gel na placa
6. Vedar as placas com fita adesiva e grampos
7. Aplicar a solução do gel com os pentes do lado contrário para delimitar a linha do gel e deixar polimerizar
8. Colocar tampão na parte inferior da cuba de eletroforese até que o nível fique abaixo do pólo
9. Retirar as fitas das placas e colocar borrachas para vedar
10. Fechar a parte superior da cuba e colocar tampão até o nível ficar um pouco acima da placa menor e abaixo da placa maior
11. Fazer a pré-corrída com tampão TBE 1x
12. Depois de 15 minutos de pré-corrída retirar cuidadosamente os pentes
13. Depois de fazer a pré-corrída retirar a uréia inserindo tampão com a seringa na placa menor
14. Colocar os pentes na linha do gel e aplicar as amostras desnaturadas

Revelação do gel com nitrato de prata:

1. Separar as placas de eletroforese, cuidando para que o gel fique na placa maior.
2. Colocar a placa com o gel em solução fixadora I, durante 20 minutos sob agitação orbital leve (pode deixar *overnight*).
3. Eliminar a solução fixadora I (pode ser armazenada e reutilizada 3 vezes) e fazer duas lavagens de 5 minutos com água destilada.

4. Eliminar a água da lavagem e acrescentar a solução fixadora II. Deixar sob agitação orbital leve durante 3 minutos.

5. Eliminar a solução fixadora II (pode ser armazenada e reutilizada 3 vezes) e fazer duas lavagens de 5 minutos com água destilada.

6. Colocar a solução de nitrato de prata e deixar sob agitação orbital leve durante 30 minutos.

7. Eliminar a solução de nitrato de prata (pode ser armazenada e reutilizada 3 vezes) e fazer uma lavagem rápida de 30 segundos com água destilada.

8. Eliminar a água da lavagem e colocar 500 mL da solução reveladora gelada (4 °C), até que adquira uma coloração preta.

9. Eliminar os 500 mL e colocar o restante da solução reveladora gelada e deixar sob agitação orbital leve constante até o completo aparecimento das bandas.

10. Eliminar a solução reveladora (não pode ser reutilizada), e colocar a solução finalizadora. Deixar sob agitação orbital leve até que pare de fazer bolhas.

11. Eliminar a solução finalizadora (pode ser armazenada e reutilizada 3 vezes) e acrescentar água destilada até total cobertura do gel.

12. Logo após o gel pode ser seco e analisado.

Após revelação os géis podem ser analisados sobre transluminador de luz clara utilizado para a leitura e análise de géis de poliacrilamida coloridos com nitrato de prata.

ANEXO 6 – Genes utilizados para o desenho de *primers*, posicionamento dos iniciadores (vermelho) e tamanho dos fragmentos (amarelo).

Primer Elongase 1S – Amplificação 152 pb (com primer)

>gi|17153492|gb|BM143425.1|BM143425 saj43h06.y1 Gm-c1072 Glycine max cDNA clone SOYBEAN CLONE ID: Gm-c1072-2652 5' similar to TR:Q9ZTK3 Q9ZTK3 FATTY ACID ELONGASE 3-KETOACYL-COA SYNTHASE 1.mRNA sequence

GTTTGGCGAGGGAGTTGATGGCAGTGGCAGGGGAGGCGTTGAAAACAAACATAACGA
CCTTGGGGCCGTTGGTTCTGCCATATTCGGAGCAGGTGATGTTCTTGG **TGTCGCTGGTGAGGAG**
GAAGGTGCTGAAGATGTCGGGGGTGAAGCCATACATTCCGGATTTCAAGCTGGCCTTGGAGCAT
TTTTGCATACACGCCGGGGGGAGAGCGGTGCTGGACGAGCTGCAGAAGAATCTTGAGCTGAGC
GAGTGGCACATGGAGCCCTCCAGGATGACCCTGCACAGATTCCGTAACACTTCCAGCAGCTCCC
TCTGGTACGAGCTGGCCTACACGGAGGCCAAGGGTCTCCAAGGGGGATCGGGTCTGGC
AGATCGCCTTCGGGTCGGGTTTCAAGTGTAACAGCGCCGTCTGGAAGGCCGTTAGGGACATGCC
ATTCTTAAAGGACTGGCGTGGCAACCCCTGNGATGACTCCATCAATAACTATCCCCTTCATCTTC
CCTCCGCATCTTCTAATTAACTCTATTAC

Primer Elongase 1N – Amplificação 168 pb (com primer)

>gi|17153492|gb|BM143425.1|BM143425 saj43h06.y1 Gm-c1072 Glycine max cDNA clone SOYBEAN CLONE ID: Gm-c1072-2652 5' similar to TR:Q9ZTK3 Q9ZTK3 FATTY ACID ELONGASE 3-KETOACYL-COA SYNTHASE 1. mRNA sequence

GTTTGGCGAGGGAGTTGATGGCAGTG **GCAGGGGAGGCGTTGAAAACA**AACATAACGA
CCTTGGGGCCGTTGGTTCTGCCATATTCGGAGCAGGTGATGTTCTTGGTGTGCTGGTGAGGAG
GAAGGTGCTGAAGATGTCGGGGGTGAAGCCATACATTCCGGATTTCAAGCTGGCCTTGGAGCAT
TTTTGCATACACGCCGGGGGGAGAGCGGTGCTGGACGAGCTGCAGAAGAATCTTGAGCTGAGC
GAGTGGCACATGGAGCCCTCCAGGATGACCCTGCACAGATTCCGTAACACTTCCAGCAGCTCCC
TCTGGTACGAGCTGGCCTACACGGAGGCCAAGGGTCTCCAAGGGGGATCGGGTCTGGC
AGATCGCCTTCGGGTCGGGTTTCAAGTGTAACAGCGCCGTCTGGAAGGCCGTTAGGGACATGCC
ATTCTTAAAGGACTGGCGTGGCAACCCCTGNGATGACTCCATCAATAACTATCCCCTTCATCTTC
CCTCCGCATCTTCTAATTAACTCTATTAC

Primer Lignina 1S - Amplificação 194 pb (com primer)

4-coumarate--CoA ligase 1817 nt

http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?egma+22101

GGACCCAGAAAGTGGTTTCTGCAGCTCCAATTCAATCTTCTACAGCAAGCGTAAGCCCC
TCCCCTCCCTCCCAACAACGCCTTAGACGTACCCACCTTCATCTCCTCCCGCGCCACCGCGC
CACCACAGCCTTCGTGACGCGCCACCGCCCGCGCCTCACCTACACCAGCTATGGCGTTCC
GTGGAGGGCGTGGCAGCCTCTCTCCGTGGACATGGGGATCCGAAAGGGCAACGTGGTCCTC
ATCCTCTCCCCAACTCCATCCACTTCCCCGTTGTGTGCCTGGCCGTCATGTCCCTCGGCGCCAT
CATCACCACCACCAACCCCTCAACACCACCCGCGAAATCGCCAAGCAGATCGCCGATTCCAAG
CCTCTCCTCGCCTTCACGATCTCTGATTTACTCCCCAAAATCACCGCAGCTGCACCCTCTCTACC
AATCGTTCTCATGGACAACGACGGCGCCTCGTGGCCACTCTTGATGAGATGGCGAAGAAGGAAC
CGGTGGCTCAGCGCGTGAAAGAGCGCGTGGAGCAGGACGACACGGCCACGCTGCTCTACTCCT
CCGGCACCACGGGGCCAGCAAGGGCGTGGTATCGTCCACCGCAACCTCATAGCAATGGTCC
AGATCGTGCTGGGTGGTTCACATGGAGGAGAACGAAACCTTCATATGCACGGTCCCCATGTTT
CACATATACGGCCTGGTCCGCTTCGCCACGGGGCTTCTGGCTTCCGGCTCCACCATCGTCTGTC
TCTCCAAGTTCGAGATGCACGACATGCTCTCCTCGATCGAGAGGTTCCGCGCCACTTAACTCCC
GCTCGTGCCGCCATTCTGGTGGCCATGCTCAACAACCGCCGCTATCAAGGGCAAGTACGAT
ATCACGTGCTGATTCGGTGTCTCCGGTGGGGCTCCGTTGAGCAAGGAGGTCATAGAGGGCT
TTGTGGCCAAGTATCCCAACGTACCATCCTTCAGGGTTATGGTTTGACGGAATCCACCGCGTT
GGGGCCTCCACCGACT**CCTTGGAGGAGAGTCAAGGT**ACGGCACGGCGGGGCTCTTGTCTCC
GGCCACCAGGCTATGATCGTCGATCCTGAATCCGGCCAATCGCTTCCGGTTAACCGCACCGG**G**

GAGCTCTGGCTCAGGGGTCCCACCATCATGAAAGGTTATTTTCAGTAACGAAGAAGCAACCACATC
AACCCTTGATTCAAAGGATGGTTAAGAACAGGGGATATTTGTTACATTGACAATGATGGATTCA
ATTTATTGTGGATCGGTTAAAGGAGCTCATCAAATACAAGGGATATCA**GGTTCCTCCAGCAG**AAC
TAGAGGCCTTGCTACTGACTCATCCTGCTATTTTAGATGCCGCTGTTATCCCGTATCCAGATAAGG
AAGCTGGGCAGCATCCAATGGCATACTGGTGAGGAAGGCTGGAAGTAGCTTATCAGAACTCA
AGTTATGGATTTTGTTCAGGACAGGTGGCTCCGTACAAGCGGATTCGAAAAGTGGCATTATTT
CCTCCATACCCAAAAATCCATCTGGCAAATTCTTCGGAAGGATCTCATCAAACCTCGCAACGTCTA
AACTCTGAATAGATGAGCTTTTTTCGTAATATATTTTTTCTATCGGAGTTGGACAAGTGAGGAAATAA
TCTTAGCTCCTTTTTTGCTGTAATTTCTGGCTTGTTACTTTTTGCTGCTTTTCATATTATCTGTTCT
TTGTTCAACAGTCTATTGTAATTTGTAGAGAACAAGTGCTGTGAGTACACCTTATAGGCAATAAA
ATTGNTTTTTGT

Primer Lignina 1N - Amplificação 180 pb (com primer)

4-coumarate--CoA ligase 1817 nt

http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?egma+22101

GGACCCAGAAAGTGGTTTCTGCAGCTCCAATTCAATCTTCTACAGCAAGCGTAAGCCCC
TCCCCTCCCTCCCAACAACGCCTTAGACGTCACCACCTTCATCTCCTCCCGCGCCACCGCGC
CACCACAGCCTTCGTCGACGCCGCCACCGCCCGCCGCTCACCTACACCAGCTATGGCGTTCC
GTGGAGGGCGTGGCAGCCTCTCTCCTCGTGGACATGGGGATCCGAAAGGGCAACGTGGTCCCTC
ATCCTCTCCCCAACTCCATCCACTTCCCCGTTGTGTGCCTGGCCGTCATGTCCCTCGGCGCCAT
CATCACCACCACCAACCCCTCAACACCACCCGCGAAATCGCCAAGCAGATCGCCGATTCCAAG
CCTCTCCTCGCCTTCACGATCTCTGATTTACTCCCCAAAATCACCGCAGCTGCACCCTCTCTACC
AATCGTTCTCATGGACAACGACGGCGCCTCGTGGCCACTCTTGATGAGATGGCGAAGAAGGAAC
CGGTGGCTCAGCGCGTGAAAGAGCGCGTGGAGCAGGACGACACGGCCACGCTGCTCTACTCCT
CCGGCACCACGGGGCCAGCAAGGGCGTGGTATCGTCCCACCGCAACCTCATAGCAATGGTCC
AGATCGTGCTGGGTCCGTTCCACATGGAGGAGAACAACCTTCATATGCACGGTCCCCATGTTT
CACATACGCGCTGGTCCGCTTCGCCACGGGGCTTCTGGCTTCCGGCTCCACCATCGTCTGTC
TCTCCAAGTTCGAGATGCACGACATGCTCTCCTCGATCGAGAGGTTCCGCGCCACTTACCTCCC
GCTCGTGCCGCCATTCTGGTGGCCATGCTCAACAACGCCGCGCTATCAAGGGCAAGTACGAT
ATCACGTCGCTGCATTCCGTGCTCTCCGTGGGGCTCCGTTGAGCAAGGAGGTCATAGAGGGCT
TTGTGGCCAAGTATCCCAACGTCACCATCCTTCAGGGTTATGGTTTGACGGAATCCACCGCGTT
GGGGCCTCCACCGAC**TCCTTGAGGAGAGTCAAGGT**ACGGCACGGCGGGGCTCTTGTCTCC
GGCCACCCAGGCTATGATCGTCGATCCTGAATCCGGCCAATCGCTTCCGGTTAACCGCACCGGG
GAGCTCTGGCTCAGGGGTCCCACCATCATGAAAGGTTATTTTCAGTAA**CGAAGAAGCAACCACAT**
CAACCCTTGATTCAAAGGATGGTTAAGAACAGGGGATATTTGTTACATTGACAATGATGGATTCA
TATTTATTGTGGATCGGTTAAAGGAGCTCATCAAATACAAGGGATATCAGGTTCTCCAGCAGAAC
TAGAGGCCTTGCTACTGACTCATCCTGCTATTTTAGATGCCGCTGTTATCCCGTATCCAGATAAGG
AAGCTGGGCAGCATCCAATGGCATACTGGTGAGGAAGGCTGGAAGTAGCTTATCAGAACTCA
AGTTATGGATTTTGTTCAGGACAGGTGGCTCCGTACAAGCGGATTCGAAAAGTGGCATTATTT
CCTCCATACCCAAAAATCCATCTGGCAAATTCTTCGGAAGGATCTCATCAAACCTCGCAACGTCTA
AACTCTGAATAGATGAGCTTTTTTCGTAATATATTTTTTCTATCGGAGTTGGACAAGTGAGGAAATAA
TCTTAGCTCCTTTTTTGCTGTAATTTCTGGCTTGTTACTTTTTGCTGCTTTTCATATTATCTGTTCT
TTGTTCAACAGTCTATTGTAATTTGTAGAGAACAAGTGCTGTGAGTACACCTTATAGGCAATAAA
ATTGNTTTTTGT

Primer Lignina 2S - Amplificação 229 pb (com primer)

Cinnamoyl-CoA reductase (1795 PB)

http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?egma+16135

CTCTCTCTCCCGAGGCGTTTCCAGTTCGAAAGGTGAGGAGGAAGTTTAGGATTTGTGGT
GGTAGCAATTAATTTACGTTTATGAATGGTTGGGAACTTTAGTTCTTTTGATTTGAGGTATTTTTGT
TTGATGATGCTCTGTGAGTGTGATTGGTTGCTCATGCGATAACACTTCCCTTCTGCTTCAGTTTT
TGTTGGAAATTGTTCTTACTGATTTACATCGACTGACTGACTTGTTTCTTTTACTGTTATTGGAAT
GAGAAATTTGTGGACTATTTTCATGTTCTGATTTCAAATTCTAGTTTAAATTTGGTTGGTTGAGATTGT
GGAAGTCTATTTTTGGTTGCTTTTGCAGGGAAATGAAAGTGTCTTTGTTGGTGAAGGGTACGTGA
GAGAAACGAAAGGGGTGTGTGTTGGGTTGAATAGGTATAGATAGGATCAATGAGCAACAACAAC
GCACGAAAGGTGGTGTGTGTGACGGGTGCTTCTGGTTTCATAACTTCATGGATCGTCAAATTCCT

TCTCCAACGTGGCTACACTGTCAGGGCCACCGTTCGCTACCCAAGTAATCTGAAAAAGGTAGATC
 ACTTGGTTAACTTTGAGGGCGCAAAAAGAGAGGTTGCAGCTGTTTAAGGCAGATCTGTTGGAAGAA
 GGTTCCCTTTGACTCTGTTGTGGAAGGCTGTCATGGTGTTTTTTCACTGCTTCACCTGTCCGTTTT
 GTTGTCAACGACCCACAGGCTGAATTGCTTGATCCTGCAGTGAAGGGAACCTTTAATGTTCTCAA
 ATCATGTGCAAATCACCATCTGTCAAACGGGTTGTTTTAACTTCTTCTATTTCTGCAGTTGCATTT
 AATCGAAGACCTAAACTCCTCAAGTGGTAGTTGATGAGACATGGTTTTCAGATCCAGATGTCTGT
 AGGGAATTAGAGTTGTGGTACACACTTTCAAAGACTTTGGCTGAGGATGCTGCCTGGAATTTGT
 AAATGAAAACAGCATTGACATGATTTCTATTAACCCAACATATGGT**GGCAGGACCTCTCT**TACAACC
 AGAGATTAATGAAAGTGTTGAGCCAATTTTAAACCTAATAAATGGTAAACCATTTCCAAATAAATCT
 TTTGGATGGGTTCGATGTGAAAGATGTTGCTAATGCTCATATTCTGGCCTATGAAATTGCTTCAGCT
 AGTGGAAAGATACTTGTGGTTGAGAGAGTCAACACTACTCTGAACTTGCTACGATGTTAC**GTGG**
TCTGTACCCCACATTACAAATCCAGATAAGTGTGAGGTAGATGAGCCGTATATCCCAACATACCA
 GATTTCCACAGAAAAGGCCAAAAAAGGACTTGGGAATAGAGTTTACTCCTTTGGAAGTGAGTCTCA
 GGGAGACTGTGGAAAGCTTTAGAGAAAAGAAGATTGTCAACTTTAATCCGTGATCTATCCTAAATA
 AATAAATGTCGATGATCTCAACCACGTTCAATTTGTGACTGATAAATGTCAGGCTTCAGAAGGAAT
 TATCACTGTAAAATATGGATTGCAAACAGGTTAATATTGTTTGTGATGAAGGACCGAATATAAAAAGGA
 TAAATTGTATATACATTTCTGAACCTTTGGGCGAATTATGCTTTGTCTTTTTTATGAATTTCAACTGT
 ACAATGTTTCGAGTACAAACCTCTCGTGATTTCTAACGTCGATCTCCTTCGATTTATTCAATTGAAGAA
 AGTTAATGTACGATAGGGAAAAAATAAAGATATCAAATGTAACATACTCGAGTTTTTTTTGGGTGTT
 GAGGGTGTATTTTTGGGAGAA

Primer Lignina 2N - Amplificação 570 pb (com primer)

Cinnamoyl-CoA reductase (1795 PB)

http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?egma+16135

CTCTCTCTCCCGAGGCGTTTCCAGTTCGAAAGGTGAGGAGGAAGTTTAGGATTTGTGGT
 GGTAGCAATTAATTTACGTTTTATGAATGGTTGGGAACCTTAGTTCTTTTGATTTGAGGTATTTTTGT
 TTGATGATGCTCTGTGAGTGTGATTGGTTGCTCATCGATAAACACTTTCCCTTCTGCTTCAGTTTT
 TGTGGAAATTGTTCTTACTGATTTACATCGACTGACTGACTTGTTCCTTTTACTGTTATTGGAAT
 GAGAAATTTGTGGACTATTTTATGTTCTGATTTCAAATTTCTAGTTTAAATTTGGTTGGTTGAGATTGT
 GGAAGTCTATTTTTGGTTGCTTTTGCAGGGAAATGAAAGTGTCTTTGTTGGTGAAGGGTACGTGA
 GAGAAACGAAAGGGGTGTGTGTTGGGTTGAATAGGTATAGATAGGATCAATGAGCAACAACAAC
 GCACGAAAGGTG**GTGTGTGTGACGGGTGCTTC**TGGTTTCATAACTTCATGGATCGTCAAATTCCT
TCTCCAACGTGGCTACACTGTCAGGGCCACCGTTCGCTACCCAAGTAATCTGAAAAAGGTAGATC
ACTTGGTTAACTTTGAGGGCGCAAAAAGAGAGGTTGCAGCTGTTTAAGGCAGATCTGTTGGAAGAA
GGTTCCCTTTGACTCTGTTGTGGAAGGCTGTCATGGTGTTTTTTCACTGCTTCACCTGTCCGTTTT
GTTGTCAACGACCCACAGGCTGAATTGCTTGATCCTGCAGTGAAGGGAACCTTTAATGTTCTCAA
ATCATGTGCAAATCACCATCTGTCAAACGGGTTGTTTTAACTTCTTCTATTTCTGCAGTTGCATTT
AATCGAAGACCTAAACTCCTCAAGTGGTAGTTGATGAGACATGGTTTTCAGATCCAGATGTCTGT
AGGGAATTAGAGTTGTGGTACACACTTTCAAAGACTTTGGCTGAGGATGCTGCCTGGAATTTGT
AAATGAAAACAGCATTGACATGATTTCTATTAACCCAACCTATGGTGGCAGGACCTCTC****TTACAACC
 AGAGATTAATGAAAGTGTTGAGCCAATTTTAAACCTAATAAATGGTAAACCATTTCCAAATAAATCT
 TTTGGATGGGTTCGATGTGAAAGATGTTGCTAATGCTCATATTCTGGCCTATGAAATTGCTTCAGCT
 AGTGGAAAGATACTTGTGGTTGAGAGAGTCAACACTACTCTGAACTTGCTACGATGTTACGTGG
 TCTGTACCCACATTACAAATCCAGATAAGTGTGAGGTAGATGAGCCGTATATCCCAACATACCA
 GATTTCCACAGAAAAGGCCAAAAAAGGACTTGGGAATAGAGTTTACTCCTTTGGAAGTGAGTCTCA
 GGGAGACTGTGGAAAGCTTTAGAGAAAAGAAGATTGTCAACTTTAATCCGTGATCTATCCTAAATA
 AATAAATGTCGATGATCTCAACCACGTTCAATTTGTGACTGATAAATGTCAGGCTTCAGAAGGAAT
 TATCACTGTAAAATATGGATTGCAAACAGGTTAATATTGTTTGTGATGAAGGACCGAATATAAAAAGGA
 TAAATTGTATATACATTTCTGAACCTTTGGGCGAATTATGCTTTGTCTTTTTTATGAATTTCAACTGT
 ACAATGTTTCGAGTACAAACCTCTCGTGATTTCTAACGTCGATCTCCTTCGATTTATTCAATTGAAGAA
 AGTTAATGTACGATAGGGAAAAAATAAAGATATCAAATGTAACATACTCGAGTTTTTTTTGGGTGTT
 GAGGGTGTATTTTTGGGAGAA

Primer Lignina 3S - Amplificação 113 pb (com primer)

cinnamyl-alcohol dehydrogenase (1413 nt) http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?egma+1457+23039

CTAGTTCCAGTTGATCCTGCGTTTACAGCACTACAGTTCCACAGCATTAGCCATTAGCA
 CTATAAATAAATAGAGAACACGCGAAACACCTGATTCCCCTCCCAGACGCCGCAGAGTCAGAGA
 GAGAGATTCACTGAAACAGAGCGCAGAAGAAAATACATAAACTAATCCAGAAAATGAGCAGCGGC
 GCTGGAAAGGTGGTGTGTGTCACCGGCGCTTCCGGTTACATTGCTTCCTGGATAGTCAAATTCCT
 CCTCAATCGCGGCTACACCGTTAAGGCCACCGTTCGCGACACAAGTGATCCGAAAAAATAAACC
 ACTTGGTTGGCCTCGACGGTGCTAAGGAGAGGCTGCACCTCTACAAGGCGAATCTTCTCGAAGA
 AGGTTCTTTAACTCTGTGCTTCAAGTTGCCATGCTGTGTTTCACACTGCTTCTCCCTTTTATCA
 CAATGTCAAGGACCCCGAGGCTGAATTGTTAGACCCAGCTTTGAAGGGGACTCTCAATGTTCTGA
 AATCGTGTGTAACCTTGC**CGACGCTGGAACGCGTTGTTTTAACCTCTTCTGTTGCTGCAGTTGCG**
TACAACGGAAAGCCTCGAACTCCCGATGTAGTAGTTGATGAGACTTGGTTTTCTGACCCGGGTTT
CTGTAGGGAATCACAGATGTGGTATACACTTTCAAAGACTTTGGCCGAAGATGCTGCCTGAAAT
 TCGTAAAAGAGAACAACATTGACATGGTACTATTAACCCAGCAATGGTGATAGGACCTCTCTTGC
 ACCAGTCTTAACACAAGTGCTGCTTCAATTTAAACGTAATTAATGGTGACAAACATTTCCAAA
 TGCATCTTTTGGTTGGTCAATGTGAAAGATGTTGCAAATGCCCATATTCTAGCATATGAGAATGC
 TTCAGCTAATGGAAGGTATTGTTTGGTGGAGAGAGTGGCACACTACTCAGAAATTGTGAAGATTTT
 ACGTGATTTGTACCCGACATTACAACCTCCAGAGAAGTGTGCAGATGATAACCCATATGTGCCAAT
 ATATCAGGTATCCAAAGAAAAGGCAAAGAGCTTGGGGATTGAATATACTCCTTTGGAAGTGAGCC
 TCAAGGAGACTGTGGATAGCTTGAAGAAAAGAAGTTTACCAACTTTAATTTGTGATATCTCCTA
 GAGGAGAAAACGTTAATAATAGAAACCTTGTGTGGTTGGTCACTTGGCTTGTGATGCTCATGCTT
 CTGAACAACTTACTATTAATAAGACTTAAATCAAGATTGGTATAAGTACTGAAAGAAGCCATTCT
 TGGTCTGATTTGTACCGGTGACAATTAAGTTTCAAACATGCGTTTCCAAGTAGAGTTTGCATTACA
 AATTGTATCCCCGTTTTTATTATATTACTAGGAAATGTCTGATG

Primer Lignina 3N - Amplificação 150 pb (com primer)

cinnamyl-alcohol dehydrogenase (1413 nt)

http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?egma+1457+23039

CTAGTTCCAGTTGATCCTGCGTTTACAGCACTACAGTTCCACAGCATTAGCCATTAGCA
 CTATAAATAAATAGAGAACACGCGAAACACCTGATTCCCCTCCCAGACGCCGCAGAGTCAGAGA
 GAGAGATTCACTGAAACAGAGCGCAGAAGAAAATACATAAACTAATCCAGAAAATGAGCAGCGGC
 GCTGGAAAGGTGGTGTGTGTCACCGGCGCTTCCGGTTACATTGCTTCCTGGATAGTCAAATTCCT
 CCTCAATCGCGGCTACACCGTTAAGGCCACCGTTCGCGACACAAGTGATCCGAAAAAATAAACC
 ACTTGGTTGGCCTCGACGGTGCTAAGGAGAGGCTGCACCTCTACAAGGCGAATCTTCTCGAAGA
 AGGTTCTTTAACTCTGTGCTTCAAGTTGCCATGCTGTGTTTCACACTGCTTCTCCCTTTTATCA
 CAATGTCAAG**GACCCCGAGGCTGAATTGTTAG**ACCCAGCTTTGAAGGGGACTCTCAATGTTCTG
AAATCGTGTGTAACCTTGCCGACGCTGGAACGCGTTGTTTTAACCTCTTCTGTTGCTGCAGTTGC
GTACAACGGAAAGCCTCGAACTCCCGATGTAGTAGTTGATGAGACTTGGTTTTCTGACCCGGGT
 TTCTGTAGGGAATCACAGATGTGGTATACACTTTCAAAGACTTTGGCCGAAGATGCTGCCTGGAA
 ATTCGTAAAAGAGAACAACATTGACATGGTACTATTAACCCAGCAATGGTGATAGGACCTCTCTT
 GCAACCAGTCTTAACACAAGTGCTGCTTCAATTTAAACGTAATTAATGGTGACAAACATTTCC
 AAATGCATCTTTTGGTTGGGTCAATGTGAAAGATGTTGCAAATGCCCATATTCTAGCATATGAGAA
 TGCTTCAGCTAATGGAAGGTATTGTTTGGTGGAGAGAGTGGCACACTACTCAGAAATTGTGAAGA
 TTTTACGTGATTTGTACCCGACATTACAACCTCCAGAGAAGTGTGCAGATGATAACCCATATGTGC
 CAATATATCAGGTATCCAAAGAAAAGGCAAAGAGCTTGGGGATTGAATATACTCCTTTGGAAGTG
 AGCCTCAAGGAGACTGTGGATAGCTTGAAGAAAAGAAGTTTACCAACTTTAATTTGTGATATCT
 CCTAGAGGAGAAAACGTTAATAATAGAAACCTTGTGTGGTTGGTCACTTGGCTTGTGATGCTCAT
 GCTTCTGAACAACTTACTATTAATAAGACTTAAATCAAGATTGGTATAAGTACTGAAAGAAGCCA
 TTCTTGGTCTGATTTGTACCGGTGACAATTAAGTTTCAAACATGCGTTTCCAAGTAGAGTTTGCAT
 TACAAATTGTATCCCCGTTTTTATTATATTACTAGGAAATGTCTGATG