



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DAIANA ALVES DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E MAPEAMENTO DE GENES PARA USO
NA SELEÇÃO ASSISTIDA DE GENÓTIPOS DE SOJA COM
AUSÊNCIA DO INIBIDOR DE TRIPSINA KUNITZ E
LIPOXIGENASES**

Londrina
2009

DAIANA ALVES DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E MAPEAMENTO DE GENES PARA USO
NA SELEÇÃO ASSISTIDA DE GENÓTIPOS DE SOJA COM
AUSÊNCIA DO INIBIDOR DE TRIPSINA KUNITZ E
LIPOXIGENASES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Carpentieri Pípolo.

Co-orientador: Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor

Londrina
2009

DAIANA ALVES DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E MAPEAMENTO DE GENES PARA USO NA
SELEÇÃO ASSISTIDA DE GENÓTIPOS DE SOJA COM AUSÊNCIA
DO INIBIDOR DE TRIPSINA KUNITZ E LIPOXIGENASES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira – IAPAR

Dra. Isaias Olívio Geraldi – ESALQ

Dr. Antonio Eduardo Pípolo –
CNPSO/EMBRAPA

Dr. Mercedes Concórdia Carrão Panizzi –
CNPSO/EMBRAPA

Prof. Dra. Valéria Carpentieri-Pípolo
Orientadora
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 2009.

Quem sabe concentrar-se numa coisa e insistir nela como único objetivo, obtém, ao fim e ao cabo, a capacidade de fazer qualquer coisa.

Mahatma Gandhi

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e minha família, que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

À Deus acima de tudo.

Aos meus pais Sandra e Gilvan e minha família que sempre tiveram presentes.

À minha avó Lucia por todo amor e amizade.

À Universidade Estadual de Londrina, em especial o Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

À CAPES, pela concessão da bolsa durante a realização do curso.

À professora Dra. Valéria Carpentieri Pípolo pela orientação, amizade, paciência e confiança em mim depositada.

Ao Dr Ricardo Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor pela co-orientação, oportunidade e amizade.

Aos pesquisadores, da EMBRAPA Soja, José Marcos Gontijo Mandarinó, Mercedes Concórdia Carrão Panizzi e Francismar Marcelino pela contribuição no estudo.

Ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal da EMBRAPA Soja, pela disponibilidade de condições técnicas e materiais para a realização do estudo, em especial Silvana Rockenbach Marin pela constante atenção e aos colegas de laboratório.

Ao laboratório de Genômica e Biotecnologia de Frutos da ENSAT (École National Supérieur d'Agronomie de Toulouse, França) pela recepção e oportunidade de estágio, em especial a Jean Claude Pech, Anne Bernadac, Christina Barsan e Brigith Laforgue.

À César Rombaldi pelos valiosos ensinamentos, amizade e contribuição no trabalho.

À Thales Pereira Barreto pela amizade e parceria nos trabalhos.

À banca examinadora pela contribuição com o trabalho.

As amigas de intercâmbio Claudia Santos Gai, Silvia Graciele Hulse de Souza,
Renata Sobotka.

Aos amigos sempre presentes Maria Paula Nunes, Viviani Marçal, Carlos Eduardo
Varanda, Ciro Sumida, Amanda Davanzo, Daniela de Souza, Luciano Tomassoni e
Alexis Thanassekos.

À todos que, embora não citados, contribuíram para o sucesso desse trabalho.

SILVA, Daiana A. **Identificação e mapeamento de genes para uso na seleção assistida de genótipos de soja com ausência do inibidor de tripsina kunitz e lipoxigenases**. 2009. 61f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é um alimento com alto teor de proteína, minerais e fibras e quantidade reduzida de gordura saturada conferindo benefícios à saúde humana. Entretanto, a utilização do produto para consumo humano e animal é limitada devido à presença de fatores antinutricionais, como inibidores de tripsina e das enzimas lipoxigenases. A obtenção de cultivares de soja com ausência desses fatores tem sido alvo dos programas de melhoramento genético com a finalidade de melhorar a qualidade do alimento e reduzir custos no processamento térmico de inativação desses componentes. A seleção assistida por marcadores moleculares tem se mostrado uma eficiente ferramenta aos programas de melhoramento, uma vez que a técnica proporciona maior rapidez e praticidade. Os objetivos deste trabalho foram mapear os locos responsáveis pela expressão do inibidor de tripsina Kunitz nas sementes (KTI₃), e das enzimas Lipoxigenases 1 e 2 (Lox 1 e Lox 2), utilizando marcadores moleculares microssatélites (SSR) para realização de seleção assistida na população F₂ oriunda do cruzamento entre as variedades BRS 213 x BRS 155 e também selecionar indivíduos da mesma população com ausência de KTI₃ através do uso de marcadores moleculares específicos SCAR. Os 93 indivíduos da população F₂ foram caracterizados fenotípicamente para presença e ausência de KTI₃, Lox 1 e Lox 2 e Lox 3 nas sementes e genotípicamente para KTI₃ com os marcadores polimórficos SSR Satt 409, Satt 228, Satt 429, Satt 333 e um marcador específico baseado no alelo mutante recessivo e para Lox 1 e Lox 2 com os marcadores Sat 090 e Sat 417. Os marcadores Satt 409 e Satt 228 mapearam o gene KTI₃ no grupo de ligação A-2 da soja, a uma distância de 17,48cM e 29,64cM respectivamente. Para a realização de seleção assistida para KTI₃ o marcador específico embora de ordem dominante obteve 100% de eficiência. Os marcadores Sat 090 e Satt 417 flanquearam os genes Lox 1 e Lox 2 no grupo de ligação F do mapa genético de ligação da soja a uma distância de 3cM e 2,77cM respectivamente, sendo eficientes na seleção assistida.

Palavras-chave: *Glycine max*. Qualidade nutricional. KTI. Lox. Marcadores moleculares.

SILVA, Daiana A. **Identificação e mapeamento de genes para uso na seleção assistida de genótipos de soja com ausência do inibidor de tripsina kunitz e lipoxigenases**. 2009. 61f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is a food with high levels of proteins, minerals and fibres, and a reduced amount of saturated fat bringing benefits to human's health. However, the use of the product for human and animal feeding is limited to the presence of some antinutritional factors, as trypsin inhibitors and lipoxigenases enzymes. The development of cultivars of soybean without these factors has been one of the objectives of some genetic improvement programs to increase the quality of food and also reduce costs in thermal processing to inactivate these components. Markers Assisted Selection (MAS) has shown to be an efficient tool in the Plant Breeding Programms to improve the efficiency selection providing more speed and praticity. The aim objectives of this work were to map the locus responsible for the expression of trypsin inhibitors in the seeds (KTI₃) and the locus of Lipoxigenases 1 and 2 (Lox 1, Lox 2) using SSR markers on the F₂ population BRS 213 x BRS 155 and also select plants with absence of KTI₃ through the help of specific markers SCAR. The 93 plants of the F₂ population had been phenotypically characterized for the presence and absence of KTI₃, Lox 1, Lox 2 and Lox 3 and also genotypically characterized for KTI₃ with SSR polymorphic markers Satt 409, Satt 228, Satt 429, Satt 333 and with a specific marker based on the recessive mutant allele. For Lox 1 and Lox 2 the F₂ population had been characterized with the SSR markers Sat 090 and Satt 417. The markers Satt 409 and Satt 228 mapped the KTI₃ gene at the A-2 soybean linking group with a distance of 17,48cM and 29,64cM respectively. For KTI₃ the specific marker was 100% in efficiency. The markers Sat 090 and Satt 417 mapped the genes Lox 1 and Lox 2 at the group F of the soybean linking map with a distance of 3cM and 2,77cM respectively, being efficient in the assisted selection.

Keywords: *Glycine max*. Nutricional quality. KTi. Lox. Molecular markers.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 A CULTURA DA SOJA	13
2.2 FATORES ANTINUTRICIONAIS EM SOJA	14
2.2.1 Inibidores de proteases	15
2.2.2 Inibidores de tripsina Kunitz	15
2.3 LIPOXIGENASES	17
2.4 O USO DE MARCADORES MOLECULARES NA SELEÇÃO DE PLANTAS	18
REFERÊNCIAS	21
ARTIGO A – IDENTIFICAÇÃO DE GENES MARCADORES E SELEÇÃO ASSISTIDA EM SOJA PARA AUSÊNCIA DAS ENZIMAS LIPOXIGENASES E DO FATOR ANTINUTRICIONAL KUNITZ	26
RESUMO	27
ABSTRACT	28
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	31
MATERIAL GENÉTICO	31
ANÁLISE ELETROFORÉTICA	32
ANÁLISE QUÍMICA DE DETECÇÃO DAS ENZIMAS LIPOXIGENASE	32
EXTRAÇÃO DE DNA	33
AMPLIFICAÇÃO DOS MARCADORES	34
ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48

ARTIGO B – EXPRESSÃO TRANSITÓRIA DE GENES IDENTIFICADOS EM FRAÇÕES CROMOPLÁSTICAS OBTIDOS POR FRACIONAMENTO CELULAR EM TOMATE (<i>LYCOPERSICON ESCULENTUM MILL.</i>)	51
RESUMO.....	52
ABSTRACT	53
INTRODUÇÃO	54
MATERIAL E MÉTODOS	56
MATERIAL VEGETAL	56
EXTRAÇÃO DE RNA TOTAIS DOS FRUTOS	57
OBTENÇÃO DE CDNA.....	58
ESCOLHA DAS PROTEÍNAS E DESENVOLVIMENTO DOS INICIADORES	58
AMPLIFICAÇÃO DOS GENES	60
CLONAGEM SISTEMA GATEWAY®.....	60
Adição das Extremidades attB	61
BP Clonase	61
Sequenciamento do DNA Plasmidial.....	64
LR Clonase.....	64
EXPRESSÃO EM PROTOPLASTOS	66
RESULTADOS E DISCUSSÕES	66
CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, com uma área de aproximadamente 21,2 milhões de hectares cultivados na safra 2007/2008, gerando uma produção de 59,5 milhões de toneladas e uma produtividade de grãos média de 2.804 kg/ha (CONAB, 2008). Devido a grande importância da cultura da soja, tanto para a alimentação humana quanto animal, vem se buscando o desenvolvimento de novas variedades mais produtivas e com maior qualidade nutricional.

A soja é um alimento com alto teor de proteína, minerais e fibras e quantidade reduzida de gordura saturada, conferindo benefícios à saúde humana. Entretanto, fatores antinutricionais, como inibidores de proteases e as enzimas lipoxigenases limitam a utilização do produto (SILVA et al., 2006).

Os inibidores de proteases apresentam especificidade de inibir as enzimas proteolíticas, reduzindo a digestão protéica dos alimentos. Entre os inibidores de proteases da soja o fator Kunitz se destaca, sendo responsável por cerca de 80% da inibição da atividade trípica nos grãos. O inibidor Kunitz é uma proteína monomérica de 21.5 KDa, não glicosilada que apresenta em sua estrutura duas pontes dissulfeto, tendo atividade específica para a tripsina (ORF e HYMOWITZ, 1979; KIM et al., 1985a).

O genoma da soja contém dez genes que controlam a expressão do inibidor de tripsina Kunitz durante o ciclo de vida da planta. Foram clonados e sequenciados três destes genes (KTi_1 , KTi_2 e KTi_3), sendo KTi_3 o responsável pela expressão nas sementes. A redução da atividade do inibidor nas sementes ocorre devido à presença dos alelos mutantes recessivos *k_{ti}-k_{ti}* que através da alteração do processo de tradução confere 50% de redução em sua atividade inibidora (HYMOWITZ, 1985; JOFUKU et al., 1989).

As lipoxigenases são enzimas que catalisam a adição de oxigênio molecular aos ácidos graxos poliinsaturados, ácido linolênico e linoléico formando compostos carbonílicos que proporcionam aos grãos sabor de feijão cru (AXELROAD et al., 1981; LANZA, 1995).

Seis diferentes genes para lipoxigenases da soja foram clonados e seqüenciados, podendo ser expressos em diferentes estádios de desenvolvimento.

As isoenzimas lipoxigenases 1, 2 e 3, são mais expressas nas sementes e nos embriões na fase de maturação, enquanto as outras possuem sua expressão na maioria dos tecidos. A herança que controla a expressão dos genes correspondentes às isoenzimas Lipoxigenase 1, 2 e 3 (Lox 1, Lox 2 e Lox 3) é mendeliana simples, sendo recessivos os alelos que controlam a ausência de lipoxigenase. Os locos que controlam Lox 1 e Lox 2 estão fortemente ligados, enquanto o Lox 3 apresenta segregação independente (HILDEBRAND, 1996; KITAMURA et al., 1983).

A obtenção de cultivares de soja com menor teor de inibidores de tripsina e ausência das enzimas lipoxigenases tem sido alvo dos programas de melhoramento genético, pois a eliminação genética destas poderá contribuir no aumento do consumo do grão na alimentação, menor perda de aminoácidos essenciais e menor perda da solubilidade proteica causada pelo processamento térmico, além de redução dos custos gerados nesse processo.

A seleção assistida por marcadores moleculares tem se mostrado uma eficiente ferramenta aos programas de melhoramento, uma vez que a técnica proporciona maior rapidez, praticidade e grande capacidade de detecção de polimorfismo (CARPENTIERI-PÍPOLO et al., 2006).

Os objetivos deste trabalho foram mapear os locos KTi_3 , Lox 1 e Lox 2 utilizando marcadores moleculares microssatélites (SSR) para realizar a seleção assistida na população F_2 oriunda do cruzamento entre as variedades BRS 213 x BRS 155 e selecionar indivíduos com ausência de KTi_3 através do uso de marcadores específicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DA SOJA

A soja (*Glycine max (L.) Merrill*) é uma das espécies de plantas mais cultivada no mundo, é conhecida por suas propriedades funcionais benéficas à saúde humana e por ser uma importante fonte protéica vegetal. O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, com uma área de aproximadamente 21,2 milhões de hectares cultivados na safra 2007/2008, gerando uma produção de 59,5 milhões de toneladas e uma produtividade média de 2.804 kg/ha (CONAB, 2008).

A soja é considerada um grão de alta versatilidade, podendo ser destinada ao processamento vários produtos e subprodutos da agroindústria. Um dos produtos mais conhecidos que derivam dessa leguminosa é o óleo refinado, obtido pelo processo de esmagamento de grãos e o farelo utilizado na alimentação animal. O grão também é utilizado na fabricação de produtos industriais não alimentares, além de fonte alternativa de combustível, o biodiesel (EMBRAPA, 2007).

Quanto às características nutricionais dos grãos de soja, eles se caracterizam por possuir alto teor de proteína, minerais e fibras, quantidade reduzida de gordura saturada e a ausência de colesterol o que relaciona o consumo de soja à saúde humana. Estudos relatam uma relação entre o consumo de soja e a redução dos riscos de doenças crônicas não-infecciosas como as doenças cardiovasculares, alguns tipos de cânceres e osteoporose (SILVA et al., 2006).

Os principais componentes dos grãos de soja são proteína e óleo, sendo que o grão de soja contém cerca de 40% de proteína e 20% de óleo em peso seco, o que constitui uma boa fonte de minerais e de vitaminas do complexo B. Entretanto, os grãos também possuem fatores antinutricionais que interferem negativamente no uso da soja “in natura” na alimentação humana e animal devido principalmente aos inibidores de proteases que conferem baixa digestibilidade da proteína e presença de outros fatores que conferem textura, odores desagradáveis e sabor adstringente (MENEGUCE et al., 2005).

Os fatores antinutricionais presentes nos grãos crus de soja conferem menor ganho de peso e menor crescimento dos animais quando utilizados

em rações. Como esses fatores são ativos em grãos crus, existe a necessidade de se realizar processamento térmico para inativar esses antinutrientes e aumentar o valor nutricional dos grãos e de seus produtos (FRIEDMAN; BRANDON, 2001).

Com finalidade de reduzir os custos no processamento de soja, melhorar as características organolépticas e aumentar a aceitação pelo consumidor, os melhoristas têm buscado desenvolver cultivares de soja com baixo teor de inibidor de tripsina, ausência do inibidor de tripsina Kunitz e das lipoxigenases (DOMAGALSKI et al., 1992; SEDIYAMA et al., 1998).

2.2 FATORES ANTINUTRICIONAIS

As plantas podem responder ao ataque de insetos e doenças através de induções bioquímicas de defesa. Essas defesas podem incluir metabólitos secundários e proteínas que podem atuar como toxinas e fatores antinutricionais (MAJOR; CONSTABEL, 2008).

Os fatores antinutricionais presentes nas plantas além de atuarem como defesa, podem atuar de maneira indesejável, sendo nocivos à saúde provocando efeitos fisiológicos adversos ou diminuir a biodisponibilidade de nutrientes (SILVA; SILVA, 2000).

Os fatores antinutricionais presentes na soja são os compostos fenólicos, ácidos fenólicos, fitatos, inibidores de proteases, saponinas, lectinas, oligossacarídeos e peptídios de baixo peso molecular, considerados compostos bioativos, estando envolvidos na redução dos riscos de doenças crônicas não transmissíveis (MANDARINO, 2008).

Uma alternativa para aumentar o valor nutricional da soja é submeter os grãos a tratamento térmico, para inativação dos antinutrientes indesejáveis como os inibidores de proteases, lectinas e lipoxigenases visando aumento da digestibilidade protéica em consequência da desnaturação e flexibilização da estrutura quaternária das proteínas de reserva (FRIEDMAN; BRANDON, 2001; VANDERGRIFT, 1983).

2.2.1 Inibidores de Proteases

A presença de alto teor de inibidores de proteases nas sementes de diferentes espécies de plantas tem despertado interesse quanto suas funções fisiológicas, pois desempenham papel protetor contra o ataque de pragas e patógenos além de atuarem no armazenamento de nutrientes, prevenindo a hidrólise prematura do material de reserva no momento da germinação (LOPES, 2006).

Os efeitos nocivos dos inibidores de proteases em monogástricos alimentados com leguminosa crua têm sido atribuídos a alterações metabólicas do pâncreas (aumento da secreção enzimática, hipertrofia e hiperplasia) e redução da taxa de crescimento que é provocada pela excessiva perda fecal de proteína secretada pelo pâncreas. Como as enzimas pancreáticas são ricas em aminoácidos sulfurados e esta perda endógena não pode ser compensada pela ingestão de proteína de leguminosas, ocorre redução no crescimento (RACKIS; GUMBMAN, 1982).

Os inibidores de proteases da soja são classificados em duas principais categorias: os do tipo Kunitz, que possuem alto peso molecular e especificidade primária para tripsina, e os do tipo Bowman-Birk de baixo peso molecular e com capacidade de inibir as proteínas tripsina e quimotripsina em sítios de ligação independentes. Aproximadamente de 80% da inibição da atividade trípica nos grãos de soja é causada pela ação do fator Kunitz, resultando na redução da digestão protéica do alimento (LIENER, 1994; MIURA et al., 2001).

2.2.2 Inibidores de Tripsina Kunitz (KTi)

O inibidor de tripsina Kunitz (KTi) da soja é uma proteína monomérica não glicosilada de alto peso molecular, 21.5 KDa, que apresenta em sua estrutura duas pontes dissulfeto, tendo atividade específica para a tripsina. Os inibidores KTi pertencem a família das proteínas anti-paralelas, o que confere grande resistência ao tratamento térmico e a desnaturação química (RYAN, 1981).

O inibidor de tripsina KTi vem sendo também utilizado para acessar variações geográficas e em estudos de processos evolutivos, pois devido ao seu alto polimorfismo constitui um modelo potencial. Suas distintas formas eletroforéticas são controladas por alelos codominantes em um único loco e as análises das sequências desses mutantes sugerem que a diferenciação tenha ocorrido antes da domesticação da planta (WANG et al., 2008).

O genoma da soja contém dez genes que controlam sua expressão durante o ciclo de vida da planta. Foram clonados e sequenciados três genes (K_{Ti1}, K_{Ti2} e K_{Ti3}), sendo que K_{T1} e K_{T2} apresentam sua expressão nas folhas e haste. As análises das seqüências desses três genes revelam a ausência de íntrons e uma similaridade de 80% de K_{Ti3} e dos outros dois genes K_{Ti1} e K_{Ti2} (KRISHANAN, 2001).

Estudos genéticos indicam que um único gene é responsável pela expressão do inibidor KTi nas sementes. Três alelos desse gene (Ti^a, Ti^b e Ti^c) codificam proteínas que diferem em apenas poucos aminoácidos. Análise das seqüências de K_{Ti3} indica que este codifica uma proteína idêntica ao alelo Ti^a, o que nos leva a crer que a ação do gene K_{Ti3} é predominante nas sementes (ORF; HYMOWITZ, 1979; JOFUKU; GOLDBERG, 1989; KIM et al., 1985a).

Os alelos mutantes recessivos kti-kti devido à ocorrência de uma substituição e duas deleções de bases, alteram o processo de tradução, causando uma terminação prematura da tradução do RNA mensageiro de KTi presente nas sementes, codificando para um nível reduzido da proteína no embrião (JOFUKU et al., 1989).

As linhagens PI 157440 e PI 196168 com ausência de KTi foram identificadas, sendo PI 157440 melhor estudada e utilizada em retrocruzamentos para a obtenção de cultivares comerciais. A ausência de KTi revela que o gene não é essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta, mas atua como regulador endógeno de proteinases durante o maturação e germinação das sementes e protetores contra insetos e microrganismos (KRISHANAN, 2001).

Hymowitz 1985 em seu trabalho de caracterização eletroforética das proteínas KTi, indicou que linhas com genótipo kti-kti possuíam cerca de 50% de redução da atividade inibidora de tripsina. Essas linhagens requerem menos tempo de exposição ao tratamento térmico para a inativação desses inibidores, conseqüentemente ocorre menor perda de aminoácidos essenciais e menor perda

da solubilidade proteica, além de contribuir com a redução de custos no processamento.

2.3 AS LIPOXIGENASES

As lipoxigenases, que constituem aproximadamente 1% do total das proteínas do grão de soja, são enzimas que catalisam a adição de oxigênio molecular aos ácidos graxos poliinsaturados, ácido linolênico e linoléico. Essa ação catalítica exercida por essas isoenzimas é um dos principais fatores que causam o aparecimento de compostos carbonílicos responsáveis pelo sabor de feijão cru nos grãos de soja (AXELROAD et al., 1981; LANZA, 1995).

Saravitz e Siedow (1995) identificaram 12 diferentes isoformas das enzimas lipoxigenases da soja através de seus pontos isoelétricos, mas acredita-se que algumas dessas isoformas possam ser variantes das mesmas isoenzimas. Foram clonados e seqüenciados seis diferentes genes para a lipoxigenases da soja, sendo as isoenzimas designadas Lipoxigenases 1, 2 e 3 mais expressas nos cotilédones e nos embriões na fase de maturação, enquanto as outras possuem sua expressão constitutiva se expressando na maioria dos tecidos (HILDEBRAND, 1996)

As lipoxigenases podem estar presentes nas sementes na forma de três isoenzimas (Lox 1, Lox 2, Lox 3), a herança que controla a ausência ou presença das lipoxigenases nos grãos de soja é mendeliana simples, sendo que os alelos que controlam a ausência dessas isoenzimas são recessivos simples (KITAMURA et al., 1983).

Mutantes de lipoxigenase com acessos independentes simples para a ausência de Lox 1, Lox 2 e Lox 3 são encontrados nos antigos germoplasmas, acreditava-se que por não serem encontrados naturalmente os locos em recessividade em conjunto poderiam ser letais. Davies e Nielsen (1987) através de retrocruzamentos entre esses acessos e a cultivar "Century" obtiveram linhas duplo nulas (Lox 1⁻ Lox 3⁻ e Lox 2⁻ Lox 3⁻) e Hajika et al (1991) através de mutações induzidas por radiação raio-γ nas sementes de soja obtiveram o mutante triplo nulo, confirmando a não letalidade dos alelos recessivos, mas sim a existência da forte

ligação entre Lox 1 e Lox 2 que impedia o aparecimento da recombinação destes genes naturalmente.

A atividade das enzimas lipoxigenases encontrada no mutante triplo nulo durante a maturação é reduzida e equivalente às encontradas nos duplos nulo e o mutante nulo para Lox 3 continua apresentar certo nível de atividade (WANG et al., 1994; TAVARES, 1993).

A remoção genética das isoenzimas lipoxigenases da soja pode contribuir para melhora dos caracteres organolépticos, eliminação do sabor desagradável podendo resultar no aumento do consumo na alimentação (SEDIYAMA et al, 1998).

2.4 O USO DE MARCADORES MOLECULARES NA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS SUPERIORES

A combinação de métodos clássicos de melhoramento genético com tecnologias da genética molecular de análises de DNA tem contribuído significativamente para a ampliação do conhecimento genético e aceleração dos programas de melhoramento. O uso de análises do polimorfismo de fragmentos de DNA permite aplicar a tecnologia dos marcadores moleculares em inúmeros estudos de genética e melhoramento de plantas como estudos da diversidade genética, caracterização dos bancos de germoplasma e mapeamento genético, seleção assistida, entre outras (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Devido à grande importância da cultura da soja mundialmente vários métodos tem sido aplicados no estudo de sua estrutura e função gênica para obtenção de génotipos melhorados, como a construção de mapas de ligação mais saturados pelo desenvolvimento de novos marcadores baseados em sequências expressas EST's, integração dos caracteres agronômicos de interesse à esses mapas, desenvolvimentos de mapas físicos, sequenciamento de genes de interesse, coleções de plantas mutantes, seleção assistida entre por marcadores moleculares, entre outras (HARADA; XIA, 2004).

A seleção de génotipos superiores através do uso de marcadores moleculares em programas que objetivam a introgressão de genes por meio de retrocruzamentos é um exemplo largamente utilizado de seleção assistida que busca

principalmente introduzir características de herança simples, como resistência à doenças, selecionar genótipos mais próximos ao genótipo recorrente com menor número de ciclos, acelerando assim a obtenção de novos cultivares melhorados, pois esta proporciona maior rapidez, praticidade e grande capacidade de detecção de polimorfismo (CARPENTIERi-PÍPOLO et al., 2006).

Segundo Sakiyama (1993), o termo marcador tem sido utilizado para designar fatores morfológicos, fisiológicos, bioquímicos ou genéticos que permitem o estudo comparativo de genótipos e de suas progênes. Entre esses marcadores, os moleculares são os mais utilizados nos estudos de genética e melhoramento.

Dentre os marcadores moleculares, os marcadores baseados em PCR (Reação da polimerase em cadeia) possuem boa eficiência, uma vez que consistem na síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA. Os marcadores microssatélites (SSR) são marcadores baseados em reação de PCR e se caracterizam por possuírem regiões altamente repetitivas distribuídas pelo genoma. Esses marcadores apresentam alto grau de polimorfismo, expressão co-dominante, resultando em elevado conteúdo de informações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores SCAR (Região amplificada de seqüência caracterizada) são derivados de marcas RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), são de natureza dominante, mas são considerados eficientes, pois amplificam regiões específicas do DNA genômico (WENG et al., 1998).

Nos últimos anos alguns pesquisadores contribuíram muito para o estudo genético molecular de características que conferem a qualidade alimentar dos grãos de soja. Kim et al. (2006 b), mapearam o gene responsável pela expressão do inibidor Kunitz nas sementes no grupo de ligação A-2 da soja, identificando ligação ente KTi_3 e os marcadores SSR Satt 228, Satt 429 e Satt 409.

Moraes et al. (2006), utilizando marcadores específicos (SCAR) realizaram seleção assistida para ausência do inibidor Kunitz e lectina em uma população segregante, obtendo 100% de eficiência na seleção.

Natarajan et al. (2006), caracterizaram o inibidor de tripsina Kunitz em quatro diferentes grupos que consistiam de soja selvagem, cultivares antigos americanos, cultivares modernos americanos e cultivares asiáticos, concluindo a existência de uma maior variação entre as linhas selvagens e cultivadas do que

entre os genótipos pertencentes ao mesmo grupo, embora tenha se detectado variação de KTi_1 , KTi_2 e KTi_3 entre e dentro dos grupos.

Kim (2004 c) e Kim (2006 d), mapearam Lox 1 e Lox 2 no grupo de ligação F da soja, entre os marcadores SSR Sat 090 e Sat 074. Barreto (2008) com o auxílio de marcadores SSR identificou ligação entre Lox 3 e Satt 212 do grupo de ligação E da soja a uma distância de 24,1 cM, sendo esses dados consistentes com os resultados obtidos por Reinprecht et al. (2006) que obtiveram uma distância de 25,4 cM.

REFERÊNCIAS

AXELROD, V.; CHEESBROUGH, T. M.; LAASKO, S. Lipoxigenase from soybeans. *Methods. Enzymology*, New York, v. 71, p. 441-451, 1981.

BARRETO, T. P. **Mapeamento de genes de lipoxigenase para uso na seleção assistida**. 2008. .Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; GARCIA, J. D.; RINALDI, D. A. Desenvolvimento e aplicações de marcadores moleculares. In: **Biotecnologia na agricultura: aplicações e biossegurança**. Cascavel: Coodetec, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO.- CONAB. **Indicadores da agropecuária**. Brasília : Conab, 2008. Ano 17, n. 4. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 10 dez. 2008.

DAVIES, C. S.; NIELSEN, N. C. Registration of Soybean Germplasm that Lacks Lipoxigenase Isozymes. **Crop Science**, v. 27, p. 370-371, 1987.

DOMAGALSKI J. M., KOLLIPARA K. P., BATES A. H., BRANDON D. L., FRIEDMAN, M., HYMOWITZ T. Nulls for the major soybean Bowman-Birk protease inhibitor in the genus *Glycine*. **Crop Science**, v. 32, p. 1502- 1505, 1992.

EMBRAPA, 2007. **Soja: diferentes usos dos grãos**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=25&cod_pai=29>. Acesso em: 29 maio 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Aplicações de marcadores moleculares na genética e melhoramento de plantas. In: **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Embrapa, 1998.

FRIEDMAN, M.; BRANDON, D. L. Nutritional and health benefits of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 3, p. 1069-1086, 2001.

HAJIKA M., IGITA K., KITAMURA K. A line lacking all three seed lipoxigenase isozymes in soybean induced by gamma-ray irradiation. **Jpn. J. Breeding**, v. 41, p. 507-509, 1991.

HARADA, K.; XIA, Z. Soybean genomics: efforts to reveal the complex genome. **Breed. Sci.** v. 54, p. 215–224, 2004.

HILDEBRAND, D. Genetic of soybean lipoxigenases. In: *Lipoxigenase and lipoxigenases pathway enzymes*. Champaign, Illinois, 1996. p. 33-38.

HYMOWITZ, T. Anti-nutritional factors in soybeans genetics and breeding. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 3., 1985. **Proceedings...** Boulder and London: Westview Press, 1985.

JOFUKU, K. D.; GOLDBERG, R. B. Kunitz Trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the soybean life cycle and in the transformed tobacco plants. **Plant Cell**, v. 1, p. 1079-1093, 1989.

JOFUKU, K. D.; SCHIPPER, R. D.; GOLDBERG, R. B. A frameshift mutation prevents Kunitz trypsin inhibitor mRNA accumulation in soybean embryos. **Plant Cell**, v. 1, p. 427-435, 1989.

KIM, M. Y.; HA, B. K.; JUN, T. H.; HWANG, E. Y.; VAN, K.; KUK, Y. I.; LEE, S. K. Single nucleotide polymorphism discovery and linkage mapping of lipoxygenase-2 gene Lx2 in soybean. **Euphytica**, v. 135, p. 169-177, 2004 c.

KIM, M.; PARK, M.; JEONG, W.; NAM, K.; CHUNG, J. SSR marker tightly linked to the *Ti* locus in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Euphytica**, v. 152, n. 3, p. 361-366, 2006 b.

KIM, S., H.; HARA, S.; HASE, S.; IKENAMA, T.; TODA, H.; KATAMURA, K.; KAIZUMAMA, N. Comparative study in amino acid sequences of Kunitz type soybean trypsin inhibitors, **T1a, T1b and T1c**. **Biochemics**, v. 98, p. 435-448, 1985a.

KIM, Y. S.; MOON, J. K.; CHO, J. H.; KIM, H. T.; PARK, K. Y.; KIM, S. J. Improvement of special characters on three elite soybean cultivars by marker-assisted selection. **Treat. Of Crop. Sci**, v. 7, p. 197-210, 2006d.

KITAMURA, K.; DAVIES, C. S.; KAIZUMA, N.; NIELSEN, N. C. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. **Crop Science**, Madison, v. 23, p. 924-927, 1983.

KRISHNAN, H. B. Characterization of a soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutant with reduced levels of Kunitz trypsin inhibitor. **Plant Science**, v. 160, p. 979-986. 2001.

LANZA, M. A. **Marcadores moleculares RAPD na introgressão de genes para ausência de lipoxigenases e da proteína A5A4B3 em soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1995. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybeans foods. **CRC Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 31-67, 1994.

LOPES, J. L. S. **Purificação e investigação das propriedades físico-química dos inibidores de proteases extraídos de sementes de *Acassia plumosa lowe***. 2006. Dissertação – Instituto de Física de São Carlos, Universidade São Paulo, São Carlos.

MAJOR, I. T.; CONSTABEL, C. P. Functional analysis of the Kunitz trypsin Inhibitor family in Poplar reveals biochemical diversity and multiplicity in defenses against herbivores. **Plant Physiology**, v. 146, p. 888-903, March 2008.

MANDARINO, J. M. G. Composto antinutricionais da soja: caracterização e propriedades funcionais. in: alimentos funcionais benefícios a saúde. 2008.

MENEGUCE, B. et al. Interação genótipo x ano para tempo de cozimento e sua correlação com a massa e percentagem de embebição em soja tipo alimento. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 4, p. 463-476, out./dez. 2005.

MIURA, E.; BINOTTI, M.; CAMARGO, D. S.; MIZUBUTI, I. Y., IDA, E. L. Avaliação biológica de soja com baixas atividades de inibidores de tripsina e ausência do inibidor Kunitz. **Arch Latinoam Nutr**, v. 51, n. 2 p. 1-8, 2001.

MORAES, R. M. A.; SOARES, T. C. B.; COLOMBO L. R.; SALLA M. F. S.; BARROS J. G. A. PIOVESAM N. D.; BARROS E. G.; MOREIRA, M. A. Assisted selection by specific DNA markers for genetic elimination of the Kunitz trypsin inhibitor and lectin in soybean seeds. **Euphytica**, n. 149 p. 221–226, 2006.

NATARAJAN, S.; XU, C.; BAE, H.; BAILEY, B. A. Proteomic characterization of Kunitz trypsin inhibitors in wild and cultivated soybean genotypes. **Plant Physiology**, v. 164, p. 756-763, 2006.

ORF, J. H.; HYMOWITZ, T. Inheritance of absence of kunitz trypsin inhibitor in seed protein of soybeans. **Crop Science**, v. 19, p. 107-109, 1979.

RACKIS, J. J.; GUMBMAN, M. R. Protease inhibitors: physiological properties and nutritional significance. In: ORY, R. L. **Antinutritional and natural toxicants in foods**. Westport : Food & Nutrition Press, 1982. p. 203-237.

REINPRECHT, Y.; POYSA, V. W.; YU, K.; RAJCAN, I.; ABLETT, G. R.; PAULS, K. P. Seed and agronomic QTL in low linolenic acid, lipoxygenase-free soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) germplasm. **Genome/National Research Council Canada = Genome/Conseil national de recherches Canada**. v. 49, p. 1510–1527, 2006.

RYAN, C. A. Proteinase inhibitors. In: Marcus A. (Ed.). **Biochemistry of plants**. New York: Academic Press, 1981. v. 6, p. 351–370.

SAKIYAMA, N. S. Marcadores moleculares e as hortaliças. **Horticultura Brasileira**. v. 11, n. 2, p. 204-2006. 1993.

SARAVITZ, D. M.; SIEDOW, J. N. The Lipoxygenase Isozymes in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Leaves (Changes during Leaf Development, after Wounding, and following Reproductive Sink Removal). **Plant Physiology**, v. 107, p. 535-543, 1995.

SEDIYAMA, C. S.; QUEIROZ, L. R.; MOREIRA, M. A.; REZENDE, S. T. **Aldehyde production and physiological quality of soybean seeds lacking lipoxygenase isozymes**. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE. Kasetsart: University Press, 1998. p. 441-446.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Antinutricional factors: protease inhibitors and lectins. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 3-9, 2000.

SILVA, M. S. V.; NAVES, M. M.; OLIVEIRA, R. B.; LEITE, O. S. M. Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Rev. Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 571-576, 2006.

TAVARES, J. T.; TAVARES, D. Q.; MIRANDA, M. A. C. . Enzymatic analysis of soya beans lacking lipoxigenases. **Food Agric**, v. 62, n. 2, p. 207-208, 1993.

VANDERGRIFT, W. L. Value of soybean meals in swine feeding. In:1983 GEORGIA NUTRITION CONFERENCE FOR THE FEED INDUSTRY, 1983, Atlanta. **Proceedings...** Atlanta: University of Georgia, 1983. p. 75-81.

WANG, K.J.; TAKAHATA, Y.; KONO, Y.; KAIZUMA, N. Alelic differentiation of Kunitz trypsin inhibitor in wild soybean (*Glycine soja*) **Theor Appl Genet**, v. 117, p. 565-573, 2008.

WANG, W. H.; TAKANO, T.; SHIBATA, D.; KITAMURA, K.; TAKEDA, G. Molecular basis of a null mutation in soybean lipoxygenase 2: substitution of glutamine for an ironligand histidine. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 91, p. 5828-5832, 1994.

WENG, C.; KUBISIAK, T. L.; STINE, M. SCAR markers in a longleaf pine x slash pine F1 family. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 5, n. 4, p. 239-247, 1998.



ARTIGO A: IDENTIFICAÇÃO E MAPEAMENTO DE GENES PARA USO NA SELEÇÃO ASSISTIDA DE GENÓTIPOS DE SOJA COM AUSÊNCIA DO INIBIDOR DE TRIPSINA KUNITZ E LIPOXIGENASES.

Resumo

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é um alimento com alto teor de proteína, minerais e fibras e quantidade reduzida de gordura saturada conferindo benefícios à saúde humana. Entretanto, a utilização do produto para consumo humano e animal é limitada devido à presença de fatores antinutricionais, como inibidores de tripsina e das enzimas lipoxigenases. A obtenção de cultivares de soja com ausência desses fatores tem sido alvo dos programas de melhoramento genético com a finalidade de melhorar a qualidade do alimento e reduzir custos no processamento térmico de inativação desses componentes. A seleção assistida por marcadores moleculares tem se mostrado uma eficiente ferramenta aos programas de melhoramento, uma vez que a técnica proporciona maior rapidez e praticidade. Os objetivos deste trabalho foram mapear os locos responsáveis pela expressão do inibidor de tripsina Kunitz nas sementes (KTi_3), e das enzimas Lipoxigenases 1 e 2 (Lox 1 e Lox 2), utilizando marcadores moleculares microssatélites (SSR) para realização de seleção assistida na população F_2 oriunda do cruzamento entre as variedades BRS 213 x BRS 155 e também selecionar indivíduos da mesma população com ausência de KTi_3 através do uso de marcadores moleculares específicos SCAR. Os 93 indivíduos da população F_2 foram caracterizados fenotipicamente para presença e ausência de KTi_3 , Lox 1 e Lox 2 e Lox 3 nas sementes e genotipicamente para KTi_3 com os marcadores polimórficos SSR Satt 409, Satt 228, Satt 429, Satt 333 e um marcador específico baseado no alelo mutante recessivo e para Lox 1 e Lox 2 com os marcadores Sat 090 e Sat 417. Os marcadores Satt 409 e Satt 228 mapearam o gene KTi_3 no grupo de ligação A-2 da soja, a uma distância de 17,48cM e 29,64cM respectivamente. Para a realização de seleção assistida para KTi_3 o marcador específico embora de ordem dominante obteve 100% de eficiência. Os marcadores Sat 090 e Satt 417 flanquearam os genes Lox 1 e Lox 2 no grupo de ligação F do mapa genético de ligação da soja a uma distância de 3cM e 2,77cM respectivamente, sendo eficientes na seleção assistida.

Palavras-chave: *Glycine max*. Qualidade nutricional. KTi . Lox. Marcadores moleculares.

Abstract

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is a food with high levels of proteins, minerals and fibres, and a reduced amount of saturated fat bringing benefits to human's health. However, the use of the product for human and animal feeding is limited to the presence of some antinutritional factors, as trypsin inhibitors and lipoxygenases enzymes. The development of cultivars of soybean without these factors has been one of the objectives of some genetic improvement programs to increase the quality of food and also reduce costs in thermal processing to inactivate these components. Markers Assisted Selection (MAS) has shown to be an efficient tool in the Plant Breeding Programs to improve the efficiency selection providing more speed and praticity. The aim objectives of this work were to map the locus responsible for the expression of trypsin inhibitors in the seeds (KTI₃) and the locus of Lipoxygenases 1 and 2 (Lox 1, Lox 2) using SSR markers on the F₂ population BRS 213 x BRS 155 and also select plants with absence of KTI₃ through the help of specific markers SCAR. The 93 plants of the F₂ population had been phenotypically characterized for the presence and absence of KTI₃, Lox 1, Lox 2 and Lox 3 and also genotypically characterized for KTI₃ with SSR polymorphic markers Satt 409, Satt 228, Satt 429, Satt 333 and with a specific marker based on the recessive mutant allele. For Lox 1 and Lox 2 the F₂ population had been characterized with the SSR markers Sat 090 and Satt 417. The markers Satt 409 and Satt 228 mapped the KTI₃ gene at the A-2 soybean linking group with a distance of 17,48cM and 29,64cM respectively. For KTI₃ the specific marker was 100% in efficiency. The markers Sat 090 and Satt 417 mapped the genes Lox 1 and Lox 2 at the group F of the soybean linking map with a distance of 3cM and 2,77cM respectively, being efficient in the assisted selection.

Keywords: *Glycine max*. Nutricional quality. KTi. Lox. Molecular markers.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, com uma área de aproximadamente 21,2 milhões de hectares cultivados na safra 2007/2008, gerando uma produção de 59,5 milhões de toneladas e uma produtividade de grãos média de 2.804 kg/ha (CONAB, 2008). Devido a grande importância da cultura da soja, tanto para a alimentação humana quanto animal, vem se buscando o desenvolvimento de novas variedades mais produtivas e com maior qualidade nutricional.

A soja é um alimento com alto teor de proteína, minerais e fibras e quantidade reduzida de gordura saturada, conferindo benefícios à saúde humana. Entretanto, fatores antinutricionais, como inibidores de proteases e as enzimas lipoxigenases limitam a utilização do produto (SILVA et al., 2006).

Os inibidores de proteases apresentam especificidade de inibir as enzimas proteolíticas, reduzindo a digestão protéica dos alimentos. Entre os inibidores de proteases da soja o fator Kunitz se destaca, sendo responsável por cerca de 80% da inibição da atividade triptica nos grãos. O inibidor Kunitz é uma proteína monomérica com peso molecular aproximadamente de 21.5 KDa, não glicosilada que apresenta em sua estrutura duas pontes dissulfeto, tendo atividade específica para a tripsina (BRANDON; FRIEDMAM, 1993; ORF; HYMOWITZ, 1979).

O genoma da soja contém dez genes que controlam a expressão do inibidor de tripsina Kunitz durante o ciclo de vida da planta. Foram clonados e sequenciados três destes genes (KTi_1 , KTi_2 e KTi_3), sendo KTi_3 o responsável pela expressão nas sementes. A redução da atividade do inibidor nas sementes é devida à presença dos alelos mutantes recessivos *kTi-kTi* que através da alteração do processo de tradução confere 50% de redução em sua atividade inibidora (HYMOWITZ, 1985; JOFUKU et al., 1989).

As lipoxigenases são enzimas que catalizam a adição de oxigênio molecular aos ácidos graxos poliinsaturados, ácido linolênico e linoléico formando compostos carbonílicos que proporcionam aos grãos sabor de feijão cru (AXELROD et al., 1981; LANZA, 1995).

Seis diferentes genes para lipoxigenases da soja foram clonados e seqüenciados, podendo ser expressos em diferentes estádios de desenvolvimento. As isoenzimas lipoxigenases 1, 2 e 3 (Lox 1, Lox 2 e Lox 3), são mais expressas nas sementes e nos embriões na fase de maturação, enquanto as outras possuem sua expressão na maioria dos tecidos. A herança que controla a expressão dos genes Lox 1, Lox 2 e Lox 3 é mendeliana simples, sendo recessivos os alelos que controlam a ausência. Os locos que controlam Lox 1 e Lox 2 estão fortemente ligados, enquanto o Lox 3 segrega independente (HILDEBRAND, 1996; KITAMURA et al., 1983).

A obtenção de cultivares de soja com menor teor de inibidores de tripsina e ausência das enzimas lipoxigenases tem sido alvo dos programas de melhoramento genético, pois a eliminação genética destas poderá contribuir no aumento do consumo do grão na alimentação, menor perda de aminoácidos essenciais e menor perda da solubilidade proteica causada pelo processamento térmico, além de redução dos custos gerados no processamento térmico de inativação desses componetes.

A seleção assistida por marcadores moleculares tem se mostrado uma eficiente ferramenta aos programas de melhoramento, uma vez que a técnica proporciona maior rapidez, praticidade e grande capacidade de detecção de polimorfismo (CARPENTIERI-PÍPOLO et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi mapear os locos KTi_3 , Lox 1 e Lox 2 utilizando marcadores moleculares microssatélites (SSR) para realizar a seleção assistida na população F_2 oriunda do cruzamento entre as variedades BRS 213 x BRS 155 e selecionar indivíduos com ausência de KTi_3 através do uso de marcadores específicos.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado em parceria entre o Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina e o Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Soja (CNPSO).

Material Genético

O Programa de Melhoramento de Soja para Tipos Especiais da Universidade Estadual de Londrina, tem por objetivo desenvolver cultivares com elevado valor nutricional e baixos índices de fatores antinutricionais. Com vistas nesses objetivos foram realizados cruzamentos artificiais entre as variedades BRS 213 e BRS 155.

Os cruzamentos foram realizados em casa de vegetação, na área experimental da Universidade Estadual de Londrina, na safra de 2003/2004. A variedade BRS 213 (BR 94-23354 X BR 94-23321) se caracteriza por apresentar ausência das enzimas lipoxigenases (Lox 1, Lox 2 e Lox 3), presença do inibidor de tripsina Kunitz, ciclo semi-precoce, crescimento determinado, hilo amarelo, flor branca, 39,7% de proteína e 19% de teor de óleo, enquanto a variedade BR 155 (IAS 4(2) X PI15740) apresenta teor reduzido do inibidor de tripsina Kunitz, presença das enzimas lipoxigenase 1, 2 e 3, ciclo precoce, crescimento determinado, hilo marrom-claro e flor branca (CARRÃO-PANIZZI, 2008).

As sementes F_1 obtidas foram semeadas em setembro e outubro de 2004 e a geração F_2 obtida nos meses de dezembro de 2004 e janeiro de 2005.

Análise Eletroforética SDS-Page para detecção da proteína KTi3.

A extração da proteína Kunitz foi realizada através da raspagem de cerca de dez mg das sementes. Adicionou-se às amostras 500 μ L de tampão 1M Tris-HCl, pH 8, incubando a temperatura ambiente por 30 min. Após centrifugação a 13.600 g por dois minutos, o sobrenadante foi utilizado na análise eletroforética proposta por Laemmli (1970) e modificada por Moraes et al. (2006).

A eletroforese foi conduzida por cerca de 5 horas a 120 V em gel bifásico SDS-PAGE, sendo a fase inferior (gel separador) constituído de poliacrilamida 15% e o gel superior (gel concentrador) constituído de poliacrilamida 6,8%. As proteínas foram visualizadas após coloração com 0.15% Comassie Blue R-250 seguida de lavagem com solução do ácido acético 7.5% acético e solução de metanol de 25%.

Análise Química para Detecção das Enzimas Lipoxigenases

As sementes F₂ foram caracterizadas para a atividade de lipoxigenases (Lox 1, Lox 2 e Lox 3), através do método colorimétrico proposto por Suda et al. (1995) e modificado por Kikuchi (2001). O método consiste em avaliar visualmente a mudança de coloração da amostra após a redução do β -caroteno pelo contato das enzimas lipoxigenase, onde incolor indica a presença de todas as isoenzimas, amarelo a ausência de Lox 3 e presença de Lox 1 e Lox 2, azul a ausência de Lox 1 e Lox 2 e verde a ausência de todas as isoenzimas.

Extração de DNA

Após a realização dos testes de caracterização presença e ausência das lipoxigenases e do inibidor de tripsina Kunitz as sementes foram semeadas em vasos de 5 litros em dezembro de 2007. No estágio de desenvolvimento V 2-3 foi coletado de cada planta F₂ um trifólio e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer a -80°C.

O DNA foi extraído das folhas pelo método CTAB segundo o protocolo descrito por Keim et al (1988), utilizando-se 1g de tecido triturado com N₂ líquido, tampão de extração CTAB 5% em proporção 4 vezes o tamanho da amostra, seguidas por duas extrações sucessivas em clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), precipitados em isopropanol, tratados com RNase e suspensos em TE.

A quantidade de DNA foi estimada por análise espectrofotométrica e a integridade das amostras de DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio.

Amplificação dos Genes Marcadores

Baseados em trabalhos publicados por Kim et al. (2006 a), Kim et al. (2006 b) e Kim et al. (2004 c), foram selecionados para testes nos genótipos parentais 19 marcadores SSR para KTi_3 e 8 marcadores SSR para Lox_1 e Lox_2 (Tabela 1) localizados respectivamente no grupo de ligação A-2 e F no mapa genético da soja desenvolvido por Cregan et al (1999) a fim de identificar os marcadores polimórficos ligados aos genes de interesse para validar o uso da seleção assistida.

Tabela 1. Marcadores SSR utilizados para amplificação de DNA.

<i>Marcador</i>	<i>G.L.</i>	<i>Iniciador</i>	<i>Sequência</i>
KTi_3			
Satt 228	A-2	Sense Antisense	5' - TCATAACGTAAGAGATGGTAAAAC -3 5' - CATTATAAGAAAACGTGCTAAAGAG - 3'
Satt 409	A-2	Sense Antisense	5' - CCTTAGACCATGAATGTCTCGAAGATA-3' 5' - CTTAAGGACACGTGGAAGATGACTAC-3'
Satt 429	A-2	Sense Antisense	5' - GCGACCATCATCTAATCACAATCTACTA-3' 5' - TCCCCATCATTTATCGAAAATAATAATT-3'
Satt 333	A-2	Sense Antisense	5' - GCGAATGGTTTTGCTGGAAAGTA-3' 5' - GCGCAACGACATTTTACGAAGTT-3'
Satt 209	A-2	Sense Antisense	5' - GCGGTGGATAAAAAGCCATCTCTA-3' 5' - TCCATAGGCTTAATTCTTATGATGTT-3'
Satt 347	A-2	Sense Antisense	5' - GCGAAGCCAACACATATAACATTGAAG-3' 5' - GCGGGCAAGGGGACACTACAATAATAC-3'
Satt 538	A-2	Sense Antisense	5' - GCAGGCTTATCTTAAGACAAGT-3' 5' - GGGGCGATAAACTAGAACAGGA-3'
Satt 294	A-2	Sense Antisense	5' GCGGAACCCTTTATTTGTATCCAACCTAG-3' 5' - GCGTGGTGGCACTTTGATTGTAGTA-3'
Satt 455	A-2	Sense Antisense	5' - CGGATTGTGTCTTTGTTGTTATTAT-3' 5' - ACCTCGCACACAATTTGAGTC-3'
Satt 133	A-2	Sense Antisense	5' - GCAAATGAAGAAAAGATGGATT-3' 5' - TAAAGCGATGGTTGAAGAAAG-3'
Sat 138	A-2	Sense Antisense	5' - GCGGGACTTAGGAGTCTAGTATTA-3' 5' - GGGAACAGGGATTTAGGACGAGAA-3'
Sat 097	A-2	Sense Antisense	5' - CGGCAACTGCGAAAAT-3' 5' - ACCCAACTTGTCAAACAGAC-3'

Sat 040	A-2	Sense Antisense	5' - GTTCTAGTTCTTCTTTTCACTTG-3' 5' - TTGTCATCAAATATCATCCATTT-3'
Satt 470	A-2	Sense Antisense	5' - GACCATTATGCTTTTTCTCTTT-3' 5' - CTTTATCCTCCTCCATTAGTTCTA-3'
Satt 377	A-2	Sense Antisense	5' - GCGTTTACAGGACCAGGAACCTTTTT-3' 5' - GCGGGCCAATGGAACCTTAGTCTTTTTTA-3'
Sat 378	A-2	Sense Antisense	5' GCGGTGGGGACCGGAGGAGTATAATAAT-3' 5' - GCGTGAAGGCTAATAATATAGGCATGG-3'
Satt 707	A-2	Sense Antisense	5' -GCGTGAGCAATACATTTTCTGTAAAAAAA-3' 5' - GCGATAGCATATTAATGAATCTCTGACTTT-3'
Satt 382	A-2	Sense Antisense	5' - GCGAAAGGTCGAGAAAATGAAATG-3' 5' - GCGTTTGCCTTGTTGGTGACTTG-3'
Satt 421	A-2	Sense Antisense	5' - CAAAGCTTCTTCTTCTTCT-3' 5' - CACAGGTTGAGACAAAACAAA-3'
Lox 1 Lox 2			
Sat 090	F	Sense Antisense	5' - CTCGCTGCTACTGGTC-3' 5' - AAGAATGCGTTGGATTTA-3'
Sat 074	F	Sense Antisense	5' - GGGTGAGAAAATACATGCAACTTACA-3' 5' - GGGCATCAAATTGATATTAATGTCTAA-3'
Satt 554	F	Sense Antisense	5' - GCGATATGCTTTGTAAGAAAATTA-3' 5' - GCGCAAGCCCAAATATTACAAATT-3'
Satt 218	F	Sense Antisense	5' - TCAATCAACAAAAACATAATTCTTC-3' 5' - ATTTGTGTTTTGTTTTAGCTCTCTA-3'
Satt 522	F	Sense Antisense	5' - GCGAAACTGCCTAGGTTAAAA-3' 5' - TTAGGCGAAATCAACAAT-3'
Satt 656	F	Sense Antisense	5' - GCGTACTAAAAATGGCAATTATTTGTTG-3' 5' - GCGTGTTTCAGTATTTGGATAATAGAAT-3'
Sat 417	F	Sense Antisense	5' - GCGAATATGGCGTTGAAAATAGTGAT-3' 5' - GCGACCCAGATTCTGTGCTAAGA-3'
Satt 395	F	Sense Antisense	5' - CGCGCTAGTTGAATGAATGT-3' 5' - GCGCATTGAGGAATTTTTTAT-3'

Também foi utilizado o iniciador específico (SCAR) desenvolvidos por Moraes et al. (2006), baseado nas seqüências encontradas no banco de dados GenBank depositadas por Jofuku et al (1989). Sendo as seqüências dos iniciadores apresentadas:

- KTi_3 Sense: '5 – CTTTTGTGCCTTCACCACT – 3'
- KTi_3 Antisense: '5 – GAATTCATCATCAGAACTCTA – 3'.

As reações de amplificação foram compostas de uma mistura de reação a um volume de 10 µl contendo 50 ng do DNA genômico, 10mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 1,3 mM de desoxiribonucleotídeo, 1.0 unidade de TAq polimerase e 2 µM de cada iniciador Sense e Antisense, sendo as condições geral de PCR apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Condição geral de amplificação dos marcadores.

<i>Denaturação inicial</i>	<i>35 ciclos</i>			<i>Terminação</i>	
	<i>Denaturação</i>	<i>Anelamento</i>	<i>Alongamento</i>		
94 °C	94°C	55 °C	72 °C	72 °C	4 °C
5 min	40 s	40 s	40 s	5 min	fim

Os produtos de amplificação foram separados em gel de poliacrilamida a 10% imerso em solução tampão 1X Tris-HCl . O gel foi corado com brometo de etídio (0.2 g/mL) e fotografado sob luz ultravioleta para visualização e análise das bandas de DNA.

Análise Estatística

Para a análise das ligações foi realizada a caracterização genotípica através dos indivíduos para os marcadores SSR e construída uma matriz de dados para a construção do mapa genético.

A análise de segregação de cada marcador molecular e dos marcadores fenotípicos assim como os cálculos da freqüência de recombinação e a construção do mapa genético foi realizada com o auxílio do programa GQMOL, versão 2006.9.1 (Cruz e Schuster, 2006). O agrupamento dos marcadores foi realizado utilizando valor limite de detecção (LOD) de 3,0 e utilizando a distância de Kossambi para a conversão da freqüência de recombinação para distância física em centimorgans (cM).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A avaliação fenotípica da segregação do inibidor de tripsina KTi_3 presente nas sementes foi realizada nos 93 indivíduos da população F_2 . Foram obtidos 70 indivíduos com a presença da banda da proteína de tamanho aproximado a 21,5 KDa e 23 indivíduos com a ausência da banda (Figura 1). Assim como descrito por Jofuku et al. (1989) e Natarajan et al. (2006) esta segregação se ajusta à proporção esperada de 3:1 com um valor de qui-quadrado não significativo a 1% de probabilidade (Tabela 3), confirmando a presença de um gene independente com o alelo que confere a presença de KTi_3 dominante ao alelo recessivo $kti-kti$ que confere a redução da proteína no embrião.

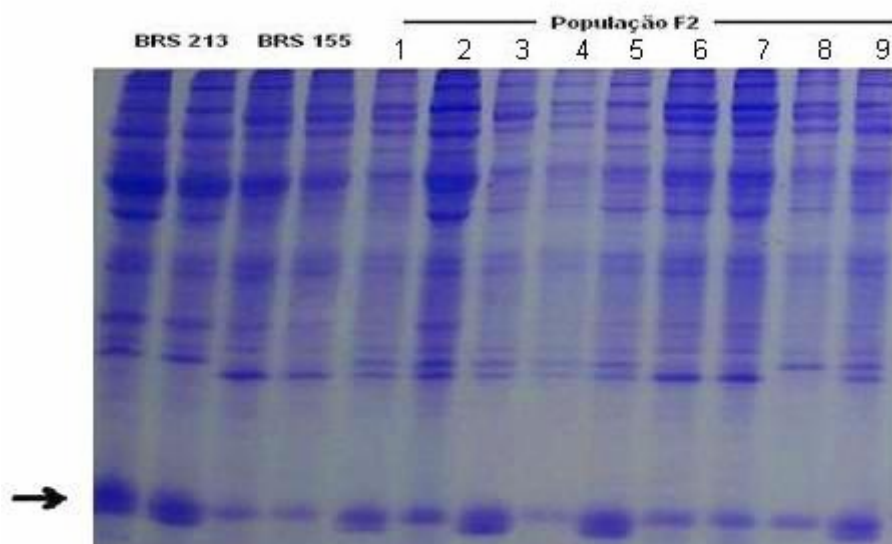


Figura 1 – Padrão de segregação fenotípica realizada através de análise eletroforética SDS-PAGE para detecção de ausência e presença de KTi_3 nas sementes da população segregante F_2 do cruzamento entre as variedades BRS 213 e BRS 155, sendo que, os parentais BRS 213 e os indivíduos 1, 2, 3, 5 e 9 mostram presença de KTi_3 , enquanto os parentais BRS 155 e os indivíduos 4, 6, 7 e 8 mostraram ausência da mesma.

Moraes et al. (2006) avaliando a população F_2 derivada de retrocruzamento da cultivar Monarca com presença de KTi_3 e Lectina e uma cultivar para ausência desses fatores também encontraram um alelo recessivo controlando a ausência de KTi_3 nas sementes da soja.

A avaliação fenotípica da segregação de Lox 1, Lox 2 e Lox 3 presentes nas sementes indicou 69 indivíduos com a presença das enzimas

Lipoxigenase 1 e 2 e 24 indivíduos com ausência das mesmas e 71 indivíduos com presença e 22 indivíduos com ausência de Lipoxigenase 3 (Figura 2).

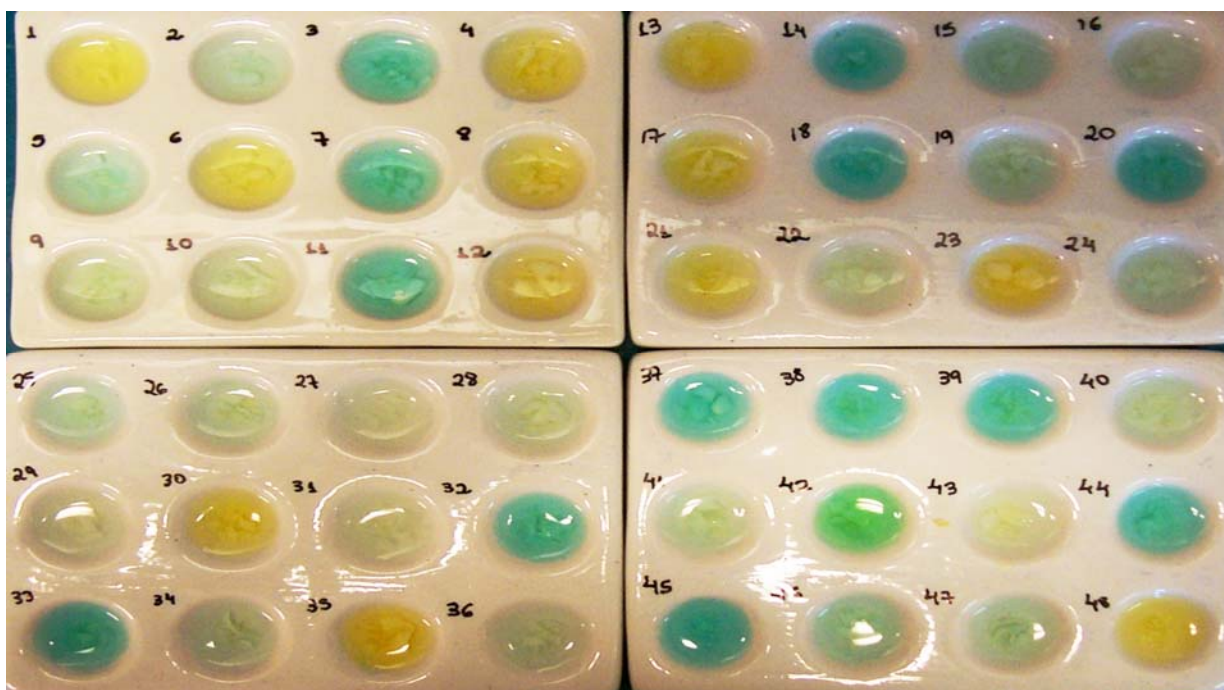


Figura 2 – Teste colorimétrico de detecção das enzimas lipoxigenases em sementes de soja proposto por Suda et al. (1995) e modificado por Kikushi (2001), onde, incolor indica a presença de todas as isoenzimas (amostras 2, 5, 9, 10, 15, 16, 19, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 34, 36, 40, 41, 43, 46, 47) amarelo a ausência de Lox 3 e presença de Lox 1 e Lox 2 (amostras 1, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 21, 23, 30, 35, 48), azul a ausência de Lox 1 e Lox 2 (amostras 3, 7, 11, 14, 18, 20, 32, 33, 37, 38, 39, 44, 48) e verde a ausência de todas a isoenzimas (amostra 47).

A segregação fenotípica observada se ajusta à proporção esperada de 3:1 para Lox 1 e Lox 2, assim como para Lox 3, com valores de qui-quadrado não significativo a 1% de probabilidade, indicando a presença da forte ligação entre Lox 1 e Lox 2 e segregação independente de Lox 3 (Tabela 3).

Embora os dois testes de caracterização fenotípica realizados, SDS-PAGE e teste colorimétricos tenham sido eficientes na detecção de polimorfismo, conferindo rapidez e facilidade de execução não é possível detectar os indivíduos heterozigotos. Por essa razão o emprego da seleção assistida por marcadores moleculares se torna uma boa ferramenta de trabalho, pois a possibilidade de identificação dos indivíduos heterozigotos aumenta a rapidez na

seleção de material com a diminuição dos ciclos de seleção, como nos casos de introgressão de genes por retrocruzamentos.

Tabela 3 – Valores de Qui-quadrado para análise da segregação fenotípica para presença e ausência de KTi e das Lipoxigenases 1 e 2 na população F₂ do cruzamento entre as variedades BRS 213 e BRS 155.

Genes	N^a	Observado^b	Esperado^c	Qui-quadrado^d
KTi	93	70: 23	3:1	0,004 ^{ns}
Lox 1 e 2	93	69: 24	3:1	0,032 ^{ns}
Lox 3	93	71: 22	3:1	0,896 ^{ns}

^a Número total de indivíduos avaliados

^b Segregação observada na população

^c Segregação esperada

^d ns – Não significativo a 1% para o teste de Qui-quadrado

Dos 20 marcadores SSR testados para KTi apenas Satt 228, Satt 409, Satt 429 e Satt 333 apresentaram polimorfismo entre os parentais e os indivíduos da população segregante (Figura 3). O baixo polimorfismo encontrado pode ser explicado possivelmente por uma baixa divergência genética entre as variedades parentais.

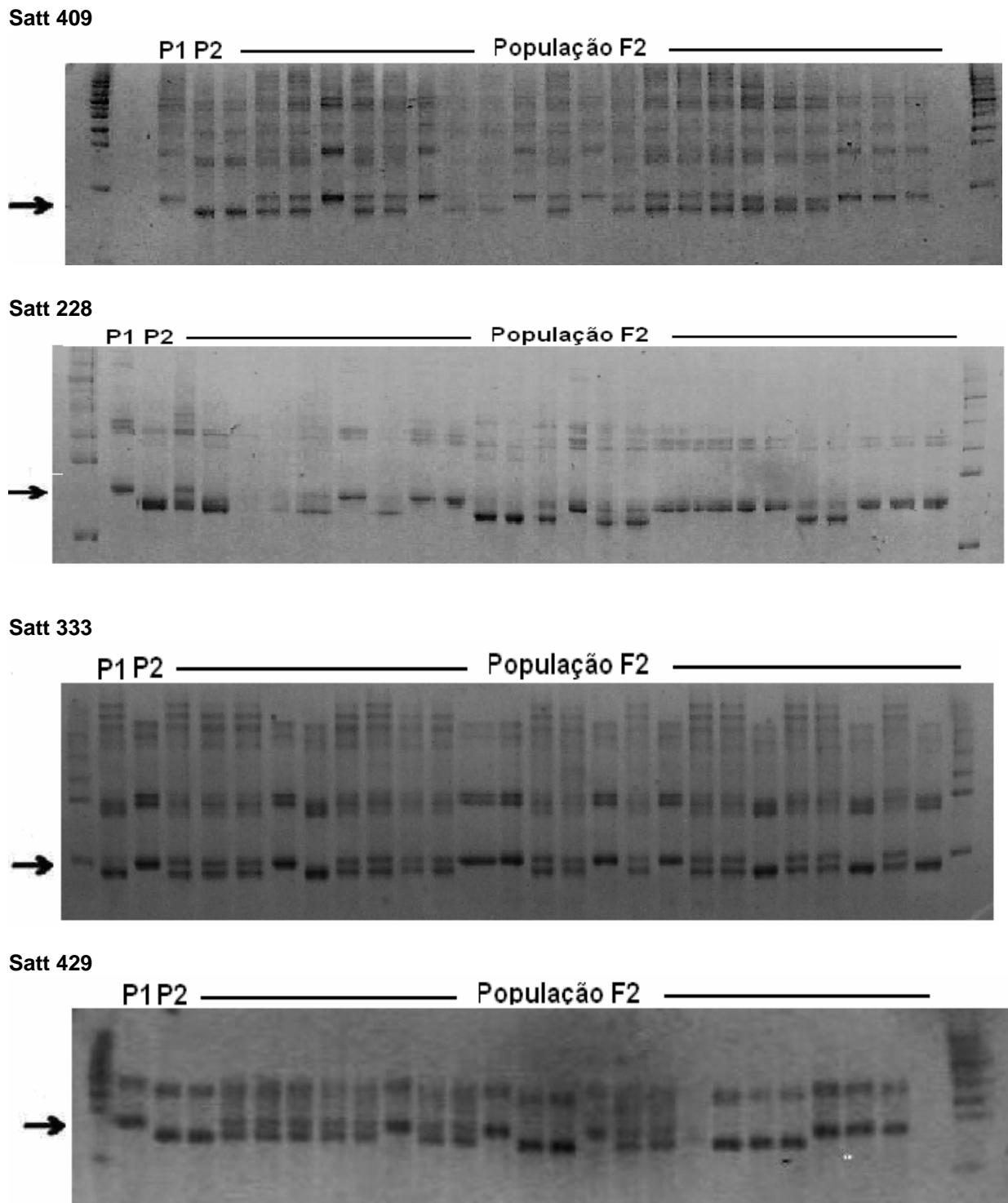


Figura 3 – Padrões de segregação de fragmentos de DNA para os marcadores SSR Satt 409, Satt 228, Satt 333 e Satt 429 nos parentais P1 (BRS213) e P2 (BRS 155) e na população segregante F₂.

A partir das análises genotípicas da população F_2 de cada marcador microsatélite analisado foi construído um mapa genético de ligação do gene KTi_3 . O gene foi mapeado no grupo de ligação A-2 da soja (Cregan et al., 1999) e a ordem dos marcadores moleculares no grupo de ligação formado coincidiu com a ordem dos mesmos no mapa consenso, entre os marcadores Satt 409 e Satt 228, a uma distância de 17,48 cM do marcador Satt 409 e 29,64 cM do marcador Sat228 (Figura 4).

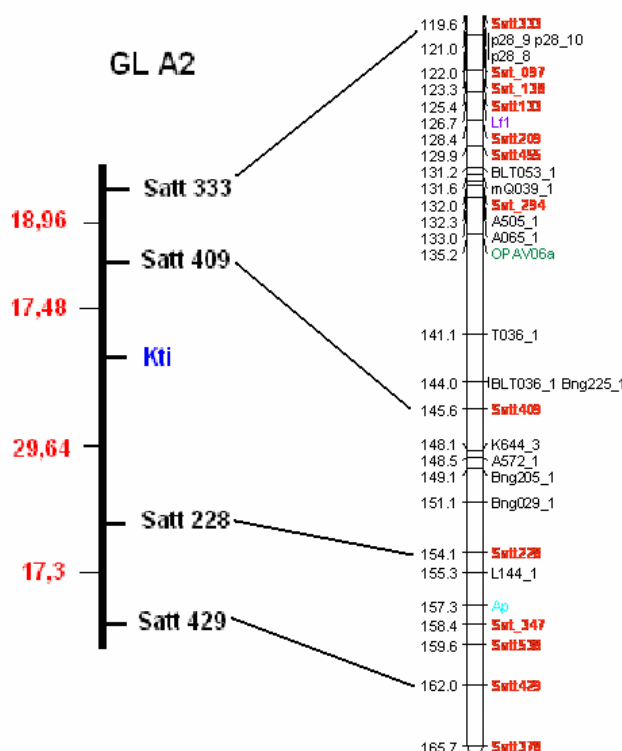


Figura 4 – Mapa de ligação da região genômica contendo o gene KTi_3 . À esquerda, o grupo de ligação obtido com a população F_2 do cruzamento entre as cultivares BRS 213 e BRS 155. À direita, parte do grupo de ligação A-2 do mapa consenso da soja. Em cada figura, os nomes dos marcadores ou do gene estão indicados à direita do grupo de ligação. No grupo de ligação da esquerda, as distâncias entre os marcadores ou entre os marcadores e o gene KTi_3 , em cM (função de Kosambi) estão indicadas à esquerda da figura. No grupo de ligação da direita, os valores à esquerda da figura indicam as distâncias genéticas cumulativas.

Ao contrário das distâncias obtidas Kim et al (2006 a) que relataram forte de ligação do marcador Satt 228 à KTi_3 , sendo este ligado a 0 cM para uma de suas populações as distâncias dos marcadores utilizados neste trabalho ao gene KTi_3 são consideradas grandes o que segundo Mohan et al (1997) resulta em baixa

eficiência na realização da seleção assistida, pois pode levar a ocorrência de “crossing-over” entre o marcador e o gene. Isso resulta em uma alta porcentagem de diagnósticos falso-positivos e/ou falso-negativos.

Os marcadores Satt 409 e o marcador específico quando avaliado através da comparação com os dados fenotípicos apresentaram segregação significativa, ou seja, não estão segregando de maneira esperada de 3:1 e os marcadores Satt 429, Satt 228 e Satt 333 apesar não apresentarem X^2 significativo apresentaram baixos valores de probabilidade, evidenciando problemas de segregação na população em estudo, podendo ser observados pela maior frequência de indivíduos homozigotos dominantes e menor frequência de indivíduos heterozigotos (Tabela 3). Reinprecht et al. (2006) e Nodari et al. (1993) relataram que o tamanho reduzido da população pode afetar a transmissão do caráter, sendo as regiões não acessadas do genoma possíveis causas das distorções na segregação.

Tabela 3 – Análise de segregação fenotípica da presença/ ausência de KTi e da segregação genotípica dos marcadores testados na população F₂ derivada do cruzamento entre as variedades BRS 213 e BRS 155.

Marcador	N ^a	Observado ^b	Esperado ^c	Qui-quadrado	Probabilidade %
KTi ₃	93	70: 23	3:1	0,004	95,2
Satt 429	88	28:38:22	1:2:1	2,45	29,3
Satt 409	86	28:46:12	1:2:1	6,37*	4,1*
Satt 228	89	30:36:23	1:2:1	4,34	11,37
Satt 333	87	24:46:17	1:2:1	1,41	49,31
Específico	92	32:38:22	1:2:1	6,32*	4,1*

^a Número total de indivíduos avaliados

^b Segregação observada na população

^c Segregação esperada

^d * Significativo a 5% para o teste de Qui-quadrado.

Apesar de o marcador específico ser dominante foi possível identificar os indivíduos heterozigotos através da avaliação genotípica e fenotípica, ou seja, os indivíduos heterozigotos apresentaram banda tanto no gel de proteínas como no gel de DNA, pois os iniciadores amplificam o alelo recessivo. Foram

identificados na população em estudo 38 indivíduos heterozigotos e 22 indivíduos homozigotos recessivos, o que comprova que para o gene KTi_3 a população não segrega na proporção esperada de 1:2: 1.

Para o emprego da seleção assistida o marcador específico foi eficiente, apresentando 100% de acerto, confirmando os dados obtidos por Moraes et al. (2006). Por ter sido desenvolvido a partir da seqüência do alelo recessivo que codifica para ausência de KTi nos grãos o marcador amplifica diretamente a região codante. (Figura 5).

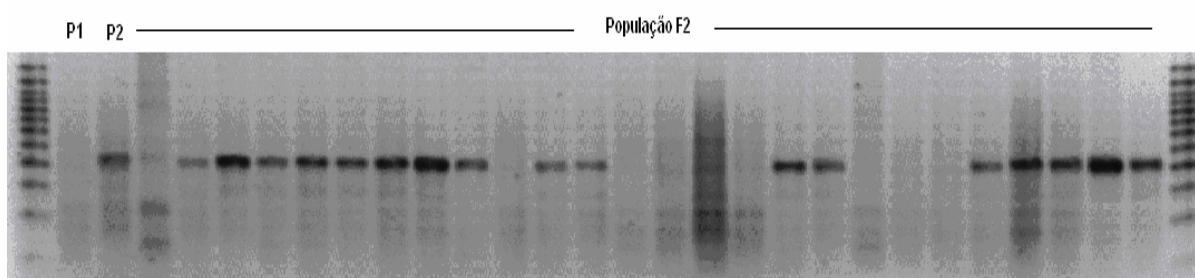


Figura 5 – Padrões de segregação de fragmentos de DNA para o marcador específico nos parentais P_1 (BRS213) e P_2 (BRS 155) e na população segregante F_2 , onde observa-se amplificação das bandas nos indivíduos que possuem o alelo recessivo.

A identificação de indivíduos heterozigotos é de grande importância nos programas de melhoramento, pois pode contribuir com a redução no número de retrocruzamentos em programas de obtenção de variedades melhoradas.

Dos 8 marcadores SSR testados para Lox_1 e Lox_2 apenas os marcadores Sat_090 e Satt 417 foram polimórficos e ligados aos genes que codificam para lipoxigenase 1 e 2, confirmando a localização no grupo de ligação F da soja, confirmando os dados obtidos por Reinprecht et al. (2006) e sendo consistentes com os dados do mapa público da soja de Cregan et al. (1999) e Palmer e Kilen (1987) (Figura 6).

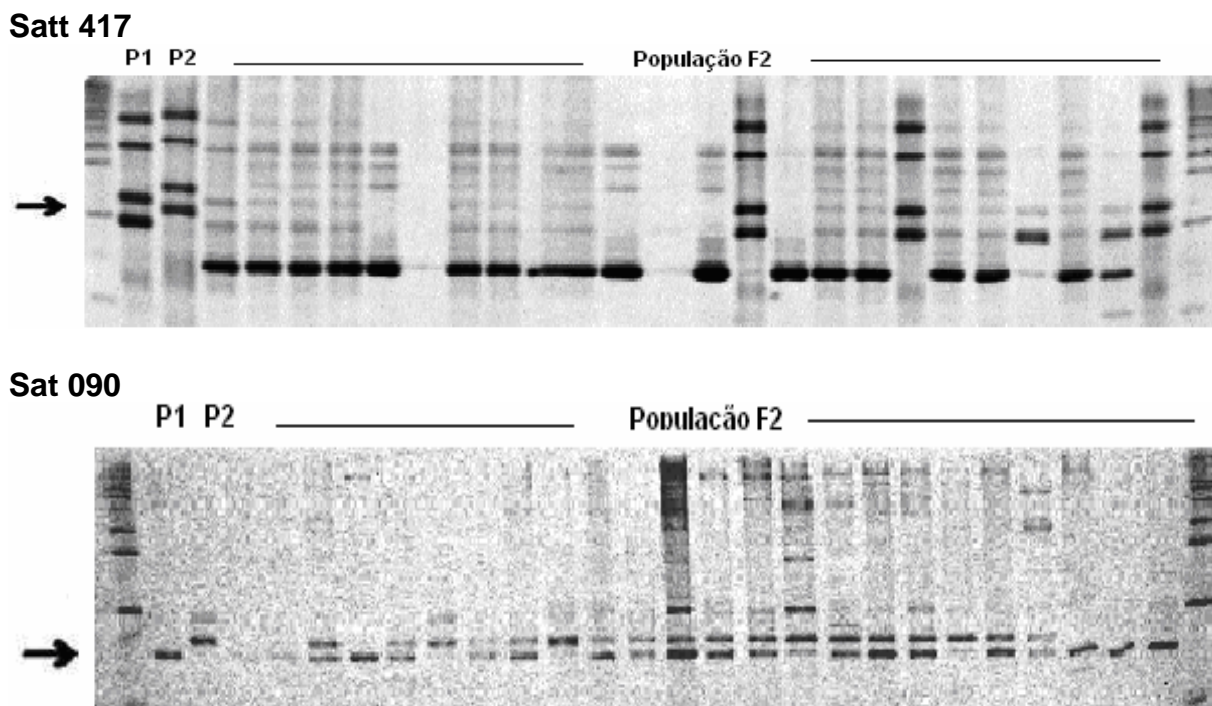


Figura 6 – Padrões de segregação de fragmentos de DNA para os marcadores SSR Satt 417 e SaT_90 nos parentais P1 (BRS213) e P2 (BRS 155) e na população segregante F₂.

Os marcadores foram eficientes para o mapeamento dos genes Lox 1 e Lox 2, sendo que a distância obtida do intervalo entre os dois marcadores foi de 5,77cM muito próxima da distância desses marcadores no mapa de Cregan (1999) que é de 5,4cM (Figura 7). Segundo Kim et al. (2004 c), Kim et al. (2006 b) e Reinprecht et al (2006) os locos que controlam a lipoxigenase 1 e 2 estariam localizados entre os marcadores Sat 090 e Sat 074 no mesmo grupo de ligação. A obtenção da ligação com o Satt 417 nos permitiu uma maior aproximação dos genes, o que resulta numa maior eficiência na realização da seleção assistida.

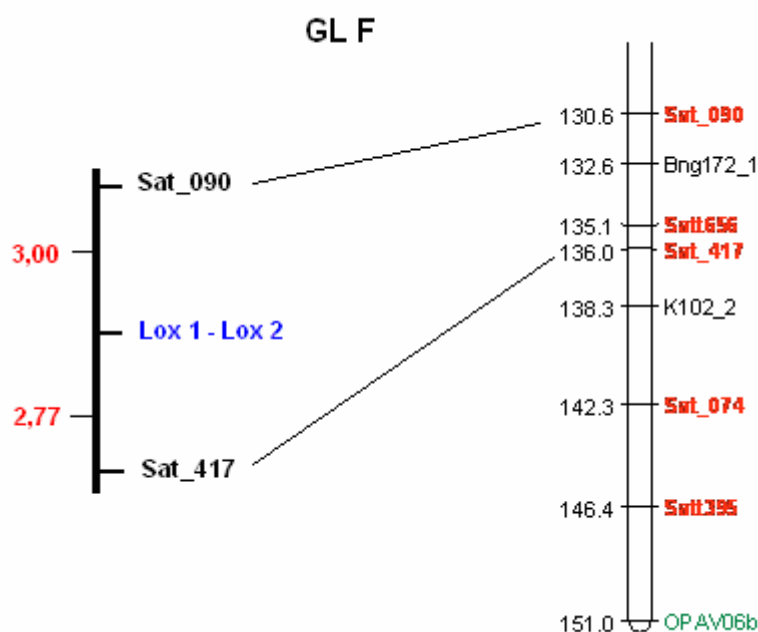


Figura 7 – Mapa de ligação da região genômica contendo os genes Lox 1 e Lox 2. À esquerda, o grupo de ligação obtido com a população F₂ do cruzamento entre as cultivares BRS 213 e BRS 155. À direita, parte do grupo de ligação F do mapa consenso da soja. Em cada figura, os nomes dos marcadores ou do gene estão indicados à direita do grupo de ligação. No grupo de ligação da esquerda, as distâncias entre os marcadores ou entre os marcadores e o gene KTi, em cM (função de Kosambi) estão indicadas à esquerda da figura. No grupo de ligação da direita, os valores à esquerda da figura indicam as distâncias genéticas cumulativas.

Para os genes Lox 1 e Lox 2 a segregação genotípica dos marcadores ocorreram na proporção esperada de 1:2:1, apresentando valor de χ^2 não significativos, além de altas probabilidades a 1% de sigificância o que confirma a confiabilidade deste mapeamento (Tabela 4). Os marcadores Sat 90 e Satt 417 apresentaram 100% e 98,9% respectivamente de acerto na seleção quando comparados com os resultados fenotípicos.

Tabela 4 – Análise de segregação fenotípica da presença/ ausência de L -1 e L-2 e da segregação genotípica dos marcadores testados na população F₂ derivada do cruzamento entre as variedades BRS 213 e BRS 155.

Marcador	Nº	Observado	Esperado	X ²	Probabilidade
L1-L2	93	69:24	3:1	0,032 ^{ns}	85,74
Sat 090	92	23:46:23	1:2:1	0 ^{ns}	100
Sat 417	91	22:44:25	1:2:1	0,297 ^{ns}	86,21

ns – Não significativo a 1% para o teste de Qui-quadrado.

CONCLUSÕES

Os marcadores de microssatélite Sat 090 e Satt 417 para Lox 1 e Lox 2, presentes no grupo de ligação F da soja, que estão a uma distância de 3 cM e 2,77 cM dos genes Lox 1 e Lox 2 respectivamente, assim como o marcador específico SCAR, são eficientes para a seleção assistida por marcadores moleculares em programas de melhoramento genético de soja.

REFERÊNCIAS

AXELROD, V.; CHEESBROUGH, T. M.; LAASKO, S. Lipoxigenase from soybeans. **Methods In Enzymology**, New York, v. 71, p. 441-451, 1981.

CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; GARCIA, J. D.; RINALDI, D. A. Desenvolvimento e aplicações de marcadores moleculares. In: **Biotecnologia na agricultura: aplicações e biossegurança**. Cascavel: Coodetec, 2006.

CARRÃO – PASINI, M. Comunicação pessoal, 2008.

COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO – CONAB. Indicadores da agropecuária. Brasília: Conab, 2008. Ano 17, n. 04. Disponível em: <www.conab.gov.br>.

CREGAN, P. B.; JARVIK, T.; BUSH, A. L.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; KAHLER, A. L.; KAYA, N.; VAN TOAI, T. T.; LOHNES, D. G.; CHUNG, J.; SPECHT, J. E. Na integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, v. 39, p. 1464-1490, 1999.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos. Versão 9.1. Viçosa: UFV, 2006.

FRIEDMAN, M.; BRANDON, D. L. Nutritional and health benefits of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 3, p. 1069-1086, 2001.

HILDEBRAND, D. Genetic of Soybean Lipoxygenases. **Lipoxygenase and lipoxygenases pathway enzymes**. Champaign, Illinois, 1996. p. 33-38.

HYMOWITZ, T. Anti-nutritional factors in soybeans genetics and breeding. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 3. **Proceedings...** Boulder and London: Westview Press, 1985.

JOFUKU, K. D.; SCHUPPER, R. D.; GOLDBERG, R. B. A frameshift mutation prevents Kunitz trypsin inhibitor mRNA accumulation in soybean embryos. **Plant Cell**, v. 1, p. 427-435, 1989.

KEIM, P.; OLSON, T. C.; SHOEMAKER, R. C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. **Soybean Genetics Newsletter**, v. 15, p. 150-152, 1988.

KIKUCHI, A. Tagging of slow rusting genes for leaf rust, Lr34 and Lr46, using microsatellite markers in wheat. **Jircas Annual Report**. p. 47-48, 2001.

KIM, M. Y.; HA, B. K.; JUN, T. H.; HWANG, E. Y.; VAN, K.; KUK, Y. I.; LEE, S. K. Single nucleotide polymorphism discovery and linkage mapping of lipoxygenase-2 gene Lx2 in soybean. **Euphytica**, v. 135, p. 169-177, 2004c.

KIM, M.; PARK, M.; JEONG, W.; NAM, K.; CHUNG, J. SSR marker tightly linked to the *Ti* locus in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Euphytica**, v. 152, n. 3, p. 361-366, 2006a.

KIM, Y. S.; MOON, J. K.; CHO, J. H.; KIM, H. T.; PARK, K. Y.; KIM, S. J. Improvement of special characters on three elite soybean cultivars by markers-assisted selection. **Treat. Of Crop. Sci**, v. 7, p. 197-210, 2006b.

KITAMURA, K.; DAVIES, C. S.; KAIZUMA, N.; NIELSEN, N. C. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. **Crop Science**, Madison, v. 23, p. 924-927, 1983.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685. 1970.

MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A.; KRISHNA, T. G.; YANO, M. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular Breeding**, v. 3, p. 87-103, 1997.

MORAES, R. M. A.; SOARES, T. C. B.; COLOMBO L. R.; SALLA M. F. S.; BARROS J.G. A. PIOVESAM N. D.; BARROS E. G.; MOREIRA, M. A. Assisted selection by specific DNA markers for genetic elimination of the Kunitz trypsin inhibitor and lectin in soybean seeds. **Euphytica**, n. 149, p. 221–226, 2006.

NATARAJAN, S.; XU, C.; BAE, H.; BAILEY, B. A. Proteomic characterization of Kunitz trypsin inhibitors in wild and cultivated soybean genotypes. **Plant Physiology**, v. 164, p. 756-763, 2006.

NODARI, R. O.; TSAI, S. M.; GILBERTSON, R. L.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean 2. Development of an RFLP- based linkage map. **Theor. Appl. Genet.**, v. 85, p. 513-520, 1993.

ORF, J. H.; HYMOWITZ, T. Inheritance of Absence of Kunitz Trypsin Inhibitor in Seed Protein of Soybeans. **Crop Science**, v. 19, p. 107-109, 1979.

PALMIER, R. G.; KILEN, T.C. Quantitative genetic and cytogenetic. **Agronomy**, v. 16, p. 135-210, 1987.

REINPRECHT, Y; POYSA, VW; Yu, K; RAJCAN, I; ABLETT, G. R.; PAULS, K. P. Seed and agronomic QTL in low linolenic acid, lipoxygenase-free soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) germplasm. **Genome/National Research Council Canada = Genome/Conseil national de recherches Canada**, v. 49, p. 1510–1527, 2006.

SILVA, M. S. V.; NAVES, M. M.; OLIVEIRA, R. B.; LEITE, O. S. M. Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Rev. Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 571-576, jul.-set. 2006.

SUDA, I.; HAJIKA, M.; NISHIBA, Y.; FURUTA, E.; IGITA, K. Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxygenase isozymes in soybean seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 742-747, 1995.



ARTIGO B –EXPRESSÃO TRANSITÓRIA DE GENES IDENTIFICADOS EM FRAÇÕES CROMOPLÁSTICAS OBTIDOS POR FRACIONAMENTO CELULAR EM TOMATE (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.).

Resumo

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma das mais importantes hortaliças produzidas no mundo. O aumento na qualidade dos frutos reflete no aumento do grau de aceitabilidade pelos consumidores, sendo que a qualidade do tomate está relacionada a atributos como boa aparência, textura, sabor e aromas. Sabe-se que o tomate possui grande quantidade de componentes voláteis e não voláteis responsáveis pela qualidade dos frutos. O metabolismo secundário, derivado de vários precursores, incluindo os carotenóides, lipídios e aminoácidos, é considerado um importante mecanismo de síntese desses componentes, acredita-se que a localização dessas proteínas nos plastídios poderia catalisar a formação desses compostos. O objetivo desse trabalho foi realizar a localização sub-celular das proteínas Ras – GTP de ligação, Adenilato quinase e Anidrase Carbônica correspondentes aos genes SGN-U312494, SGN-U313920 e SGN-U313920, que embora tenham sido isoladas a partir da fração cromoplástica de frutos no estágio “over ripening”, ou seja, completamente maduro não apresentaram localização plastidial quando submetidas a análises de suas sequências pelos programas de bioinformática de predição Predotar e Target P. Através da realização de construções GFP (Green Fluorescent protein) pelo Sistema GATEWAY® de recombinação e análise de microscopia de fluorescência foi verificada a expressão transitória dessas proteínas em protoplastos de tabaco. As construções GFP e a marcação da fração cloroplástica dos protoplastos pela proteína de fluorescência RFP (Red fluorescent protein) nos permitiram localizar a nível sub-celular as proteínas. A proteína adenilato quinase está localizada nos cloroplastos embora não seja predita como cloroplástica pelos preditores Predotar e Target P, ao contrário das proteínas GTP de ligação e Anidrase carbônica que apresentaram expressão citoplasmática confirmaram a localização citoplasmática como prevista na análise in silico.

Palavras chave: *Lycopersicon esculentum*. Formação de aromas. Localização sub-celular. Sistema de recombinação GATEWAY®.

Abstract

The tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is one of the most important vegetable produced in the world. The increase in fruit quality brings an increase in consumer acceptability once the quality of the tomato is related to characteristics such as good appearance, texture, taste and aroma. The tomato is known for having a great amount of volatile and non-volatile components which determine fruit quality. The secondary metabolism, derived from several precursors, including carotenoids, lipids, and amino acids, is considered an important synthesis mechanism of these components, and it is believed that the plastidial localization of these proteins could catalyze the development of these components. The objective of this work was to realize the sub-cellular localization of Ras – GTP binding proteins, Adenylate kinase and Carbonic Anhydrase, corresponding to the SGN-U312494, SGN-U313920 and SGN-U313920 genes, which although isolated from a chromoplastic fraction of the fruit during the over ripening stadia, i.e., completely ripe, showed no plastidial localization when submitted to a sequence analysis by Predotar-Prediction and Target P. bioinformatics programs. GFP constructions by the GATEWAY® System of recombination and microscopy analysis of fluorescence showed the transitory expression of these proteins in tobacco protoplasts. The GFP constructions and the chloroplastic fraction determination in the protoplasts by the RFP fluorescence protein helped locate the sub-cellular level of the proteins. The adenylate kinase protein is located in the chloroplasts although not predicted as chloroplastic by the Predotar and Target P predictors, as opposed to the GTP binding proteins and the carbonic anhydrase which showed cytoplasmic expression, confirming the cytoplasmic localization as predicted by the in silico analysis.

Keywords: *Lycopersicon esculentum*. Aroma formation. Sub-cellular localization. GATEWAY® recombination system.

INTRODUÇÃO

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma das mais importantes hortaliças produzidas no mundo, sendo consumida na dieta alimentar como fonte de vitaminas e minerais na forma in natura e industrializado. Sua produção mundial em 2004 foi de aproximadamente 116 milhões de toneladas. Em 2005 o Brasil ficou em oitavo lugar com uma produção de 3.394.677 toneladas, cultivada em aproximadamente 57.500 ha (FAO, 2005).

Em função do aumento de qualidade dos frutos de tomate houve uma tendência ao aumento do grau de aceitabilidade pelos consumidores, sendo que a qualidade do tomate está relacionada a atributos físicos e sensoriais, como

boa aparência, firmeza, grau de suculência, espessura da polpa, textura oral, sabor, aromas, entre outros (FERREIRA et al., 2003).

Neste contexto os programas de melhoramento genético têm contribuído para o progresso da cultura do tomate, buscando-se o desenvolvimento de cultivares mais adaptados às condições climáticas das principais regiões de cultivo, resistência a doenças e pragas, melhoria de características agronômicas e indústrias, adaptação à colheita mecanizada, maior teor de compostos fenólicos, aromas e vitaminas, maior qualidade nutracêutica como maior teor de, licopeno e carotenóides que segundo resultados de estudos epidemiológicos conduzidos na União Européia e nos EUA têm sugerido a existência de propriedades antioxidantes que são capazes de prevenir diversos tipos de câncer, doenças cardiovasculares e degenerativas (MELO; VILELA, 2005).

Sabe-se que o tomate possui grande quantidade de componentes voláteis e não voláteis responsáveis pela qualidade dos frutos, tais como sabor e aroma. O metabolismo secundário, derivado de vários precursores, incluindo os carotenóides, lipídios e aminoácidos, é considerado um importante mecanismo de síntese desses componentes. Os mecanismos envolvidos na acumulação desses metabólitos ainda não são bem esclarecidos e acredita-se que além dos carotenóides que desempenham um papel de precursores para muitos desses compostos, a localização nos plastídios de certas enzimas poderiam catalisar a formação desses compostos a partir de ácidos graxos (TIEMAN et al., 2006; SIMKIN et al., 2005).

Nesse contexto, em trabalhos precedentes com o intuito de melhor estudar esses mecanismos foram identificadas proteínas isoladas a partir da fração cromoplásticas de tomate através de fracionamento celular. No entanto é sabido que nas etapas de purificação de organelas pode ocorrer contaminação, havendo a necessidade de confirmar se realmente estas proteínas são realmente plastidiais.

Muitas proteínas possuem precursores com extensões amino-terminais denominados de peptídeos de trânsito com a finalidade de direcionar a proteína pós-transcrita para seus endereçamentos finais, sendo esses terminais removidos após a entrada da proteína na organela (JARVIS, 2008). No entanto segundo Kleffmann et al. (2004) mais de 20% das proteínas cloroplásticas

identificadas em seu estudo com *Arabidopsis Thaliana* foram provenientes de genes sem essa seqüência codificadora para o peptídeo de endereçamento plastidial.

Ainda não são bem esclarecidos os mecanismos de endereçamento dos peptídeos de trânsito, embora se evidencie a saída de muitas proteínas pelos envelopes membranários e endereçamento a novas rotas de importação como através de vesículas de secreção e a presença seqüências de endereçamento bipartido (JARVIS, 2008).

Desse modo, preditores de bioinformática constituem-se numa importante ferramenta que associada ao uso da técnica de localização sub-celular da expressão transitória de genes fusionados à GFP (Green Fluorescent Protein) constituem num meio eficaz de confirmação do endereçamento das proteínas em estudo.

O objetivo desse trabalho foi realizar a localização sub-celular das proteínas Ras – GTP de ligação, Adenilato quinase e Anidrase Carbônica correspondentes aos genes SGN-U312494, SGN-U313920 e SGN-U313920, que embora tenham sido isoladas a partir da fração cromoplástica de frutos no estágio “over ripening”, ou seja, completamente maduro não apresentaram localização plastidial quando submetidas à análises em sílico com o auxílio dos programas Predotar (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>) e Target P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>).

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratoire de Genomique et Biotechnologie des Fruis pertencente à ENSAT (École National Supérieur d’Agronomie de Toulouse, França) a partir da parceria com o Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina.

MATERIAL VEGETAL

O cultivar de tomate utilizado nesse estudo foi o Micro-Tom (*Lycopersicon esculentum* var. *Micro-Tom*), linhagem selvagem. Estas plantas foram cultivadas em substrato MS/2 (Duchefa) em fitotron com a adição semanal de solução nutritiva (Max Plant Tomato®), nas condições de 14 horas de luminosidade

e 8 horas de obscuridade, temperatura 25/20°C dia e noite respectivamente e 70% de umidade relativa.

Para a obtenção dos genes foram realizadas extrações de RNAs totais, precedida da síntese de cDNA, amplificação dos genes, clonagem em sistema GATEWAY® e sequenciamento para a confirmação.

Extração dos RNAs Totais dos Frutos

Foram extraídos os RNAs totais de frutos em cinco estádios de maturação (Figura 1), denominados de IMG (Imature Green – Verde imaturo), MG (Mature Green – Verde maduro), B (Breaker – Mudando de verde para vermelho), B+3 (Breaker + 3 dias) e B+10 (Breaker + 10 dias).

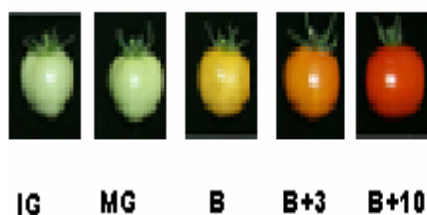


Figura 1 – Estádios de maturação dos frutos de tomate utilizados na extração dos RNAs totais.

Após a retirada das sementes os tomates foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Cada amostra foi macerada e cerca de 5g foram utilizadas para extração dos RNAs totais pelo método de extração fenol-clorofórmio seguido de CTAB e tratamento com DNase (JONES et al., 2002). Para determinar a concentração e a integridade dos RNAs. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro a uma densidade óptica de 280nm e avaliadas quanto a pureza através da verificação da relação 260/280 com valores entre 1,8 e 2. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,8% a 50V por 20 min e 100V por mais 20 min e os produtos visualizados através de coloração com brometo de etídio, apresentando nitidez nas bandas.

Obtenção do cDNA

Os cDNAs das amostras foram preparados pelo Kit de reação Transcriptase Reverse Omniscript® e a verificação da qualidade foi realizada através de uma reação de PCR com iniciadores do gene constitutivo da ubiquitina. As reações de amplificação foram compostas de uma mistura de reação a um volume de 25 µl contendo 1 µg do cDNA, 5 µl do tampão 5 x Gold HF, 10 µM de dNTP, 0.5 µM de cada iniciador e 0.02 U/µl unidade de Gold TAq polimerase, sendo as condições gerais de PCR utilizadas apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 – Condições gerais de amplificação para teste da qualidade dos cDNAs obtidos.

Denaturação Inicial	25 ciclos			Final da	
	denaturação	anelamento	Elongação	Elongação	
94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C	15 °C
5 min	0 :30 min	0 :30 min	2 min	10 min	fim

Escolha dos genes para o estudo e desenvolvimento dos iniciadores

A partir de uma extração de proteínas da fração cloroplástica foram identificadas 2400 proteínas das quais, aproximadamente 700 conheciam as funções e localizações sub-celulares. Das aproximadamente 1700 proteínas restantes foram selecionadas ao acaso para estudo as proteínas codificadas pelos genes SGN-U312494, SGN-U313920 e SGN-U313920 (Tabela 2).

Tabela 2 – Proteínas escolhidos para estudo de localização sub-celular através de construções GFP. Estão apresentados seus códigos SGN-U, homologia em *Arabidopsis thaliana* e suas funções .

Prot.	Unigene <i>Lycopersicon esculentum</i>	Homologia em <i>Arabidopsis thaliana</i>	Função	Localização Sub- celular através dos preditores Predotar e Target P
1	SGN-U312494	AT5G59840	Sinalização	Citosol
2	SGN-U313920	AT5G50370	Metabolismo de Nucleotídeos	Citosol
3	SGN-U313592	AT1G70410	Envolvimento no Ciclo de Krebs	Citosol

As seqüências dos genes foram obtidas na base de dados das solanáceas SOL (<http://www.sgn.cornell.edu/>) e submetidas a um Blast NT® na base de dados da *Arabidopsis thaliana* (<http://www.arabidopsis.org/Blast>). A partir das análises das sequências, os iniciadores foram desenhados, um começando no códon inicial (metionina) e o outro correspondente a região COOH terminal, excluindo o códon de terminação (stop) (Tabela 3).

Tabela 3 – Tamanho dos genes e seqüências dos iniciadores Sense e Anti- Sense de cada clone, começando na metionina e terminando antes do códon de terminação.

Prot	Fragmento	Iniciador Forward	Iniciador Reverse
1	648 pb	5'ATGGCTGCTCCACCTGCTAG AGCTCGTGCC 3'	5'AACCACAGCAAGCTGATTTTT GGGCAGA3'
2	729 pb	5'ATGGCTGCTTCATTAGAAGA TGTTCTTCA 3'	5'AAGACAACACATGTTTAACT CAGAAGT3'
3	768 pb	5' ATGACTTTATTT TCTACCAGTCGAGAGGTT 3'	5'GTGCAACAGAAGGAGTAAGTT TGAAGTC3'

Amplificação dos Genes

Para amplificar os genes foi utilizada a mistura equimolar dos cDNAs de cada estágio de maturação. As reações de PCR foram realizadas com a enzima Phusion® Taq polimerase. As reações de amplificação foram compostas de uma mistura de reação a um volume de 20 µl contendo 1 µl da mistura dos cDNAs dos cinco estádios de maturação, 5 µl do tampão 5 x Phusion®, HF, 10 µM de dNTP, 0.5 µM de cada iniciador e 0.04u unidade de Phusion TAq polimerase, sendo as condições gerais de PCR utilizadas apresentadas na tabela 4. Os produtos de amplificação obtidos foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1,2% durante 40 minutos a 100V e visualizadas depois de coradas com brometo de etídio.

Tabela 4 – Condições gerais de amplificação dos genes para clonagem em Sistema Gateway®.

Denaturação Inicial	35 Ciclos			Final da elongação	
	Denaturação	anelamento	elongação	72 °C	15 °C
98 °C 0 :30 min	98 °C 0 :10 min	55 °C 0 :30 min	72 °C 2 min	72 °C 10 min	15 °C fim

Clonagem pelo Sistema Gateway®

Essa tecnologia, descrita por Hartley et al. (2000) permite transferir um segmento de DNA (cDNAs, fragmentos genômicos e fragmentos de PCR) dentro de diversos vetores, sendo uma importantíssima ferramenta para o estudo da expressão de proteínas e análises das funções gênicas. Graças a esse sistema de recombinação, pode-se transferir fragmentos entre os vetores que contêm o sítio de recombinação λ mantendo suas orientações de leitura. Para a clonagem dos cDNAs pelo sistema de recombinação GATEWAY®, a primeira etapa consiste na adição das extremidades attB.

Adição das Extremidades attB aos Produtos de PCR Obtidos

A sequência terminal 5'- attB é considerada um eficiente sítio de recombinação com o vetor Donor que, pela mediação da enzima BP clonase produz o clone inteiro do produto de PCR. Os produtos obtidos para cada gene através da primeira amplificação com os iniciadores específicos foram submetidos a uma segunda reação de PCR com os iniciadores attB1 e attB2 para a amplificação das extremidades.

Sequências dos iniciadores attB :

- attB1 :

5'- GGG-ACA-AGT-TTG-TAC-**AAA-AAA**-GCA-GGC6TNN - (gene de interesse) - 3'

- attB2 :

5'-GGGG-AC-CAC-**TTT-GTA**-CAA-GAA-AGC-TGG-GTN - (gene de interesse) - 3'

As reações de PCR foram realizadas nas mesmas condições apresentadas na primeira amplificação. A partir dos produtos dessa reação foram realizadas as reações com BP clonase.

BP Clonase

Na reação BP os produtos de PCR que contêm as extremidades attB recombinam com o vetor Donor que contém os sítios attP, resulta na formação do clone inteiro flanqueados pelos sítios attL (Figura 4).

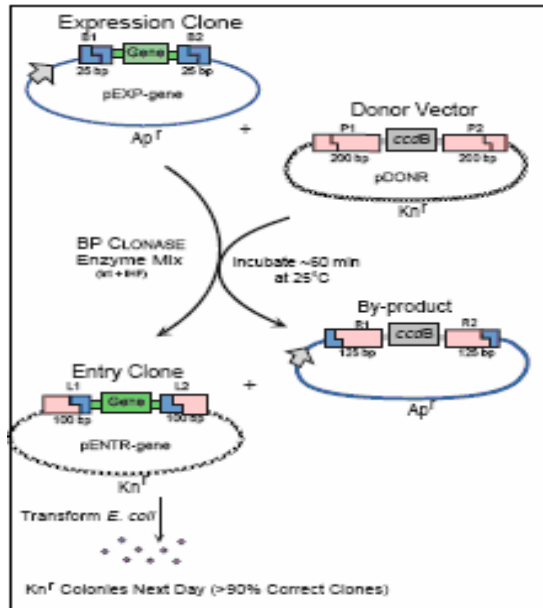


Figura 4 – Sistema GATEWAY®: Reação BP Clonase.

Os genes para as três proteínas foram clonados no vetor pDonor 207 (Figura 5) através da reação BP clonase, kit Invitrogen®. Células DH5 α (*Escherichia coli*) foram transformadas com esses clones por choque térmico e selecionadas em placas de petri contendo Gentamicina (10 μ g/ml). As colônias resistentes à gentamicina obtidas sobre o meio seletivo foram submetidas a screening para confirmar a inserção do fragmento.

Sequenciamento do DNA Plasmidial

Para confirmar a inserção do gene, os plasmídios foram submetidos a uma reação de sequenciamento de DNA. Foi utilizado o Kit BigDye® Terminator, em sequenciador ABI 3730 (Applied Biosystems).

Os resultados do sequenciamento foram analisados com a ajuda do programa Vector NIC®, pela comparação das seqüências obtidas, as seqüências dos genes disponíveis no banco de dados das solanáceas SOL (<http://www.sgn.cornell.edu/>) e as seqüências do vetor PDonor 207.

LR Clonase

A reação LR clonase se caracteriza por produzir um clone de expressão graças à recombinação entre os sítios attL do clone inteiro obtido pela BP clonase e attR do vetor de destino (Figura 6).

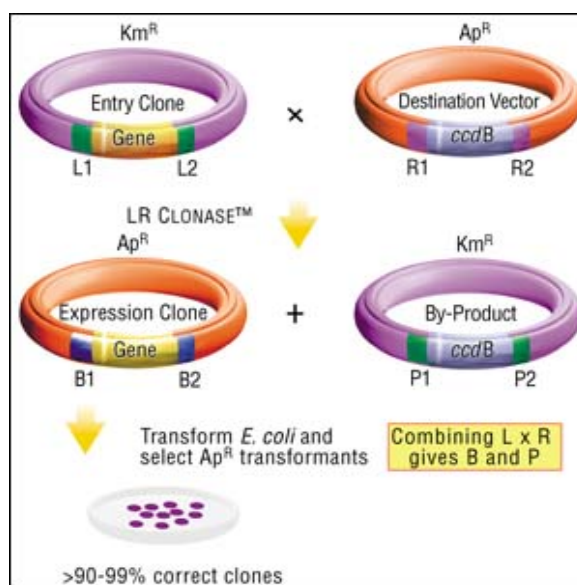


Figura 6 – Reação LR clonase.

Os plasmídios com a inserção correta dos genes foram submetidos à reação LR clonase com o vetor pMDC83 (Figura 7), que contém os genes de resistência aos antibióticos kanamicina e clorofenicol e o gene codificador da proteína de fluorescência GFP. As células DH5 α (*Escherichia coli*) foram transformadas com o clone de expressão por choque térmico utilizando o kit LR kanamicina e clorofenicol (10 μ g/ml).

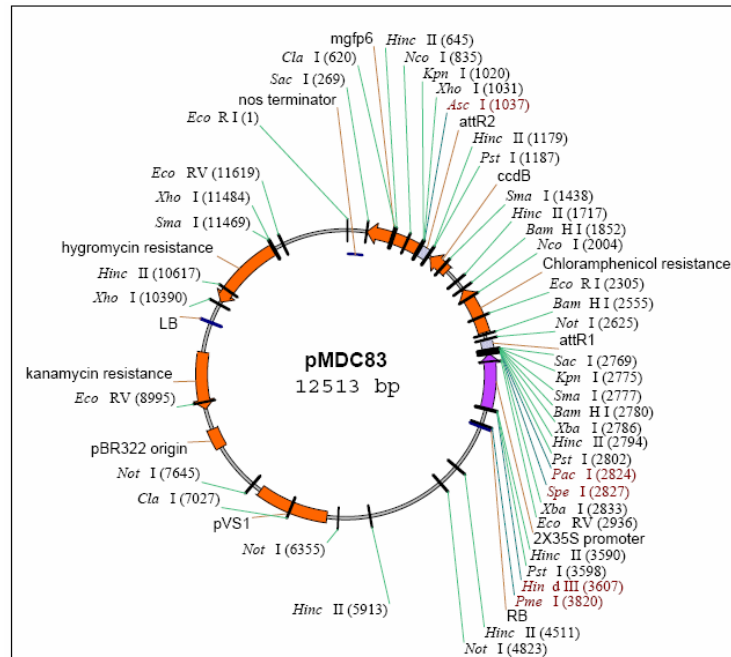


Figura 7 – Vetor pMDC83

Cada colônia isolada foi submetida à reação de PCR para confirmar a inserção do fragmento. O procedimento adotado foi o mesmo realizado na confirmação dos fragmentos da BP clonase, exceto pelos iniciadores utilizados que nesse caso são os iniciadores sense e anti-sense de cada gene. As colônias selecionadas foram colocadas em cultura em meio líquido LB com os antibióticos kanamicina e clorofenicol (10µg/ml) para a purificação dos plasmídios realizada pela utilização kit Midiprep Promega®. A qualidade e concentração dos plasmídios foram analisadas em espectrofotômetro a uma relação 260/280 nm.

Expressão em Protoplasto.

As construções dos genes codificadores das três proteínas e o tratamento controle com o promotor 35S foram clonados na extremidade C-terminal juntamente com as seqüências do gene da proteína de fluorescência GFP (Green Fluorescent Protein) no vetor pMDC83 (HELLENS et al., 2000). A região cloroplástica foi marcada com e com a proteína de fluorescência RFP (Red Fluorescent Protein). Os protoplastos usados na transformação foram obtidos das células BY-2 de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cultivadas em suspensão de acordo com o método descrito por Leclercq et al. (2005). Os protoplastos foram transformados pelo método glicol do polietileno glicol descrito por Abel et al. (1995) e

modificado por Leclercq et al. (2005), na qual a suspensão de protoplasto é transformada e incubada por 16 h a 25°C, e posteriormente analisada em microscopia confocal.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A amplificação dos genes SGN-U312494, SGN-U313592 e SGN-U313920 a partir da mistura de cDNA dos diferentes estádios de maturação, assim como a adição das extremidades attB que constituem-se no sítio de reação para ocorrência da clonagem intermediada pela BP clonase do Sistema Gateway® foi realizada com sucesso. As bandas obtidas foram posicionadas próximas à posição de 750 pb do marcador de peso de 1 Kb, concordando com os tamanhos esperados de 648 pb, 729 pb e 768 pb respectivamente obtidos na base de dados de sequenciamento de tomate Sol.

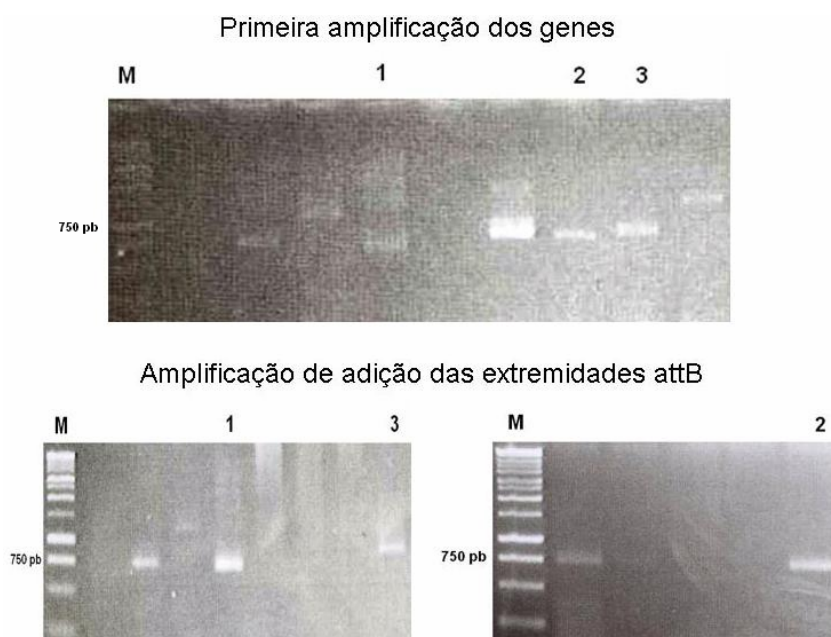


Figura 8 – Amplificação dos genes 1 (SGN-U312494), 2 (SGN-U313920) e 3 (SGN-U313920) e adição dos terminais attB aos produtos de PCR de cada gene.

Após a realização das reações BP clonase e transformação das células competentes DH5 α (*Escherichia coli*) foi confirmada a inserção do clone pelo crescimento das colônias em meio seletivo (Figura 9) e pelo sequenciamento do DNA plasmidial (dados não apresentados).

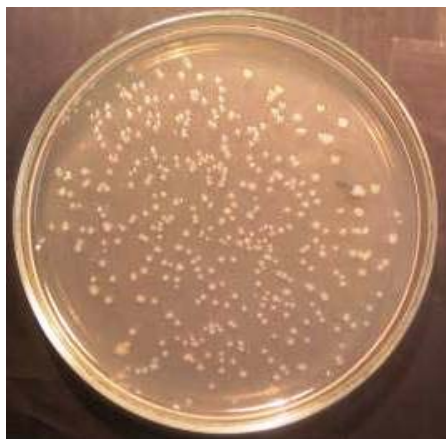


Figura 9 – Células transformadas (*Escherichia coli*) em meio de cultura seletivo contendo o antibiótico gentamicina.

Através do sistema LR clonase obteve-se os genes SGN-U312494, SGN-U313920 e SGN-U313592 fusionados à GFP no vetor de transformação pMDC83 com resistência à kanamicina e ao clorofenicol. Os plasmídios purificados contendo esses insertos foram utilizados para transformar as células de tabaco By -2, permitindo através da análise microscópica de fluorescência verificar a expressão sub-celular de cada proteína.

Para confirmar a eficiência da técnica de localização sub-celular através das construções GFP foi utilizado como controle um vetor contendo o promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor. A análise dessas células transformadas apenas com GFP indicou fluorescência em toda a célula, confirmando a expressão constitutiva desse gene (Figura 10 A).

As expressões transitórias das proteínas Ras – GTP ligante (SGN-U312494), importante na sinalização intracelular, e da proteína Anidrase carbônica putativa (SGN-U313592), importante no transporte celular de CO₂ (figuras 10 B e 10 D) foram localizadas na região citoplasmática, pois se observa a fluorescência em toda a célula. Esses resultados sugerem uma possível contaminação na extração da fração cromoplática, ou ainda, uma baixa especificidade de reconhecimento uma vez que os genes em estudo pertencem ao tomate e as células transformadas são de tabaco.

Já a construção contendo a proteína adenilato quinase (SGN-U313920), foi claramente direcionada para a região cloroplástica marcada por RFP (figura 10 C), o que confirma seu envolvimento nos processos desencadeados pelos cloroplastos, uma vez que segundo as informações encontradas banco de dados

SOL sua função está relacionada com fosfotransferases, produção de ATP e metabolismo de nucleotídeos, sendo uma possível proteína candidata a novos estudos para verificação de envolvimento com os mecanismos de formação de compostos voláteis.

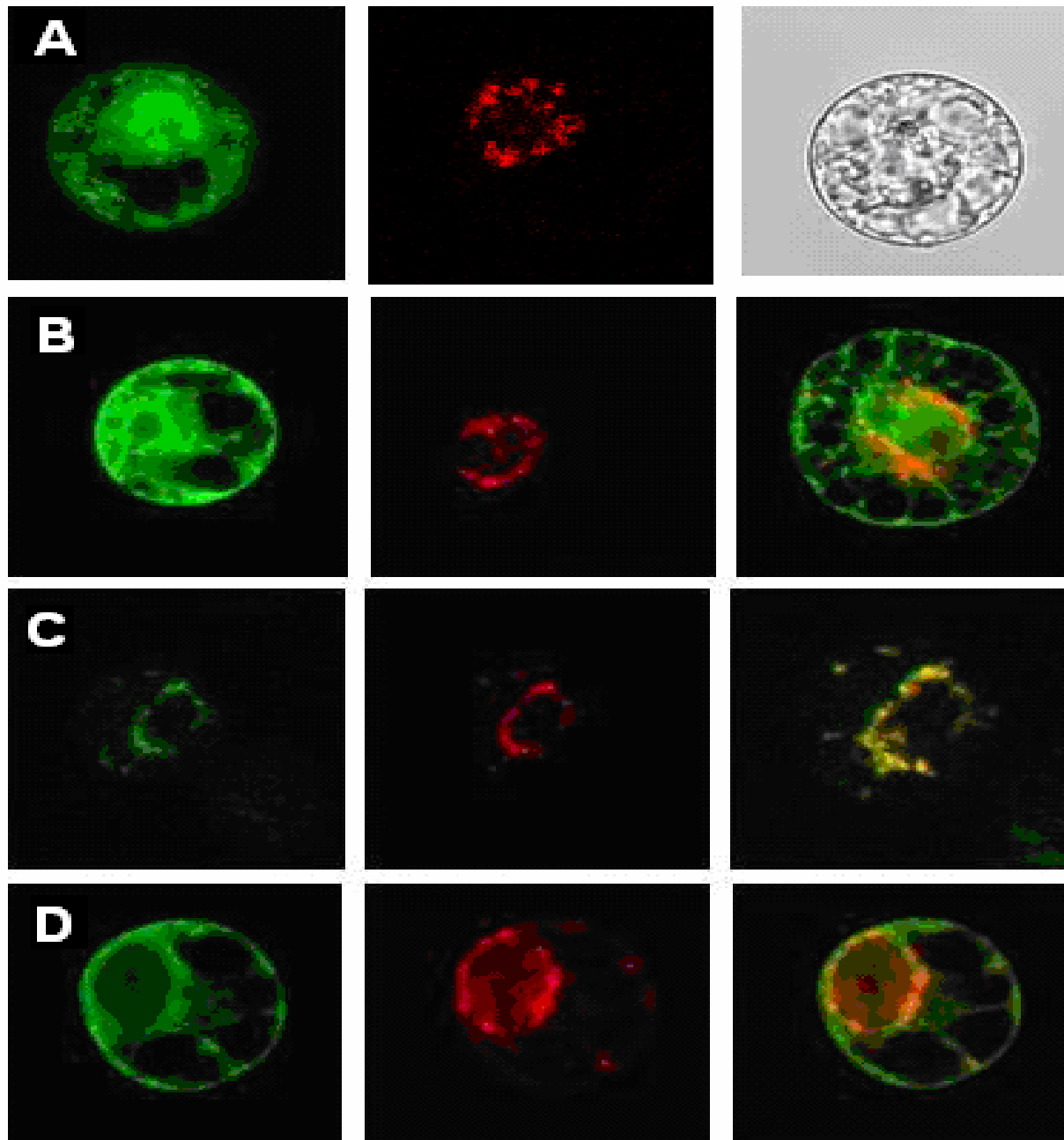


Figura 10 – Localização subcelular das construções GFP com as proteínas SGN-U312494, SGN-U313920 e SGN-U313592. As proteínas foram transitoriamente expressas nos protoplastos das células BY-2 de tabaco, sendo suas localizações analisadas por microscopia confocal. (A) Controle com a construção GFP, RFP e o promotor 35S. (B) Construção GFP, RFP e o gene SGN-U312494. (C) Construção GFP, RFP e o gene SGN-U313920. (D) Construção GFP, RFP e o gene SGN-U313592.

Esses resultados indicaram que a análise em sílico não foi suficiente para deduzir a localização sub-celular, por exemplo, o gene SGN-U 313920 que não possui peptídeo de endereçamento não foi predita como uma proteína plastidial pelos dois programas utilizados. No entanto, pela técnica de GFP foi possível verificar que a proteína é endereçada aos cloroplastos, indicando que há outra via de transporte sem necessariamente ter o peptídeo sinal de trânsito para o cloroplasto. Nos demais casos o teste de GFP confirmou as predições feitas por Predotar e TArget P.

CONCLUSÕES

A proteína Adenilato quinase está localizada nos cloroplastos embora não seja predita como cloroplástica, ao contrário das proteínas GTP de ligação e Anidrase carbônica que confirmaram os resultados da análise em sílico.

REFERÊNCIAS

ABEL, S.; NGUYEN, M. D.; CHOW, W.; THEOLOGIS, A. ACS4, a primary indole acetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1- carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*: structural, characterization, expression in *Escherichia coli*, and expression characteristics in response to auxin. **Journal of Biological Chemistry** v. 270, p.19093–19099, 1995.

FAO-FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2005. **Produção agrícola**. 2005. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 5 mar. 2009.

FERREIRA, S. M. R.; FREITAS, R. J. S.; BASSLER, T. C. Terminologia descritiva para análise sensorial de tomate de mesa. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 1, p. 07-12, 2003.

HARTLEY, J. L.; TEMPLE, G. F.; BRASCH, M. A.. DNA Cloning using *in vitro* Site-Specific Recombination. **Genome Research**, v. 10, p. 1788-1795, 2000.

HELLENS, R. P.; EDWARDS, A. E.; LEYLAND, N. R.; BEAN, S.; MULLINEAUX, P. pGreen: A versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Plant Mol. Biol.** v. 42, p. 819–832, 2000.

JARVIS, P. Review: targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. **New Phytologist**, v. 179, n. 2, p. 1-28, 2008.

JONES, B.; FRASSE, P.; OLMOS, E.; ZEGZOUTI, H.; LI, Z.G.; LATCHE, A.; PECH, J. C.; BOUZAYEN, M. Down-regulation of DR12, an auxin-response-factor homolog, in the tomato results in a pleiotropic phenotype including dark green and blotchy ripening fruit. **Plant Journal**. v. 32, p. 603–613, 2002.

KLEFFMANN, T.; RUSSENBERGER, D.; VON ZYCHLINSKI, A.; CHRISTOPHER, W.; SJOLANDER, K.; GRUISSEN, W.; BAGINSKI, S. The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. **Current Biology**, v. 14, p. 354-362, 2004.

LECLERCQ J.; RANTY B.; SANCHEZ-BALLESTA M. T.; Li Z.; JONES B.; JAUNEAY, A.; PECH, J. C.; LATCHE, A.; RANJEVA, R.; BOUZAYEN, M. Molecular and biochemical characterization of LeCRK1, a ripening-associated tomato CDPK-related kinase. **Journal of Experimental Botany**. v. 56, p. 25–35, 2005.

MELO, P. C. T.; VILELA, N. J. Desafios e perspectivas para a cadeia brasileira do tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 154-157, jan./mar. 2005.

SIMKIN, A. J.; SCHWARTZ, S. H.; AULDRIDGE, M.; TAYLOR, M. G.; KLEE, H. J. The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles beta-ionone, pseudoionone and geranylacetone. **Plant Journal**, v. 40, p. 882-892, 2004.

TIEMAN, D. M.; ZEIGLER, M.; SCHMELZ, E. A.; TAYLOR, M. G.; BLISS, P.; KIRST, M.; KLEE, H. J. Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits. **J. Exp. Bot.**, v. 57, p. 887-896, 2006.