

ANNA CRISTINA LANNA

EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE
ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS EM SOJA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

ANNA CRISTINA LANNA

EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE
ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS EM SOJA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA EM: 27 de março de 2002.

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Conselheiro)

Profa. Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Conselheira)

Prof. Juraci Alves de Oliveira

Profa. Miriam Abreu Albuquerque

Prof. Maurílio Alves Moreira
(Orientador)

Ao meu filho Matheus.
Aos meus pais Flávio e Maria Helena.
À minha irmã Márcia.
À minha sobrinha Rayane.

AGRADECIMENTO

A Deus, por iluminar o meu caminho e dar-me forças para vencer mais uma etapa de vida.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização do Programa; e, em especial, ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pelas ótimas condições de trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus familiares, em especial ao meu filho, pela compreensão e incondicional apoio.

Ao Professor Maurílio Alves Moreira, pela orientação e confiança durante todo o Mestrado e Doutorado.

À Professora Conselheira Maria Goreti da Almeida Oliveira, pelas sugestões, pela amizade e pela preocupação e interesse na minha formação acadêmica.

Ao Professor Juraci Alves de Oliveira e à Professora Miriam Abreu Albuquerque, pelos ensinamentos práticos de manipulação de radioisótopos e equipamentos relacionados.

Aos estudantes de doutorado Abelmon Gesteira, Denise Bazzolli, Andréia Barcelos e Inês Chamel, pela amizade, pela paciência e, principalmente, pelo auxílio no trabalho prático e nas discussões dos resultados.

Aos meus amigos dos laboratórios do BIOAGRO, pela ótima convivência e ajuda mútua.

BIOGRAFIA

Anna Cristina Lanna, filha de Flávio Moreira Lanna e Maria Helena Trivelato Lanna, nasceu no dia 25 de julho de 1968, na Cidade de Ponte Nova, MG.

Em 1987, iniciou o curso superior na Universidade Federal de Viçosa (UFV), graduando-se, em agosto de 1992, Bacharela e Licenciada em Química.

Em setembro desse mesmo ano, ingressou no Curso de Mestrado em Agroquímica da UFV, submetendo-se à defesa de tese em 17 de março de 1995.

Em 1998, iniciou o Doutorado em Fisiologia Vegetal, nessa mesma Instituição, submetendo-se à defesa de tese em março de 2002.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE QUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
CAPÍTULO I	10
EFEITO DA TEMPERATURA NO CONTEÚDO DE ÓLEO E DE ÁCIDOS GRAXOS DO GRÃO DE SOJA DURANTE O SEU ENCHIMENTO	10
1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1. Material genético	14
2.2. Determinação do conteúdo de óleo bruto	15
2.3. Obtenção dos metil-esteres de ácidos graxos	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4. CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

	Página
CAPÍTULO II	29
ENZIMAS ENVOLVIDAS NO ENRIQUECIMENTO CITOPLASMÁTICO DE ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS PARA A BIOSÍNTESE DO ÓLEO EM SEMENTES DE SOJA	29
1. INTRODUÇÃO	29
1.1. Colinafosfotransferase (CPT)	31
1.2. Lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT)	32
2. MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1. Fonte de enzimas	34
2.2. Obtenção do extrato bruto	35
2.3. Determinação de proteínas totais no extrato microsomal	36
2.4. Métodos analíticos cinéticos	36
2.4.1. Compostos radioativos e determinação da radioatividade nas amostras contendo ^{14}C	36
2.4.2. Medida da atividade da colinafosfotransferase, através da incorporação de ^{14}C colina em fosfatidilcolina, a partir de CDP- ^{14}C colina	38
2.4.2.1. Curva de tempo para formação de fosfatidil ^{14}C colina	39
2.4.2.2. Efeito da temperatura na formação de fosfatidil ^{14}C colina	39
2.4.2.3. Determinação dos parâmetros cinéticos	39
2.4.3. Medida da atividade da lisofosfatidilcolina aciltransferase, através da incorporação de ^{14}C oleoil em lisofosfatidilcolina, a partir de ^{14}C oleoil-CoA e palmitoil-lisofosfatidilcolina	40
2.4.3.1. Curva de tempo para formação de fosfatidilcolina- ^{14}C oleoil	40
2.4.3.2. Efeito da temperatura na formação de fosfatidilcolina- ^{14}C Oleoil	41
2.4.3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos	41
2.5. Determinação da atividade da colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase em sementes de soja, submetidas a diferentes temperaturas	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1. Colinafosfotransferase	43

	Página
3.1.1. Curva de tempo para formação de fosfatidil[¹⁴ C]colina	43
3.1.2. Efeito da temperatura na formação de fosfatidil[¹⁴ C]colina	43
3.1.3. Determinação dos parâmetros cinético-enzimáticos, $K_{m_{app}}$ e $V_{max_{app}}$, para colinafosfotransferase	45
3.2. Lisofosfatidilcolina aciltransferase	47
3.2.1. Curva de tempo para formação de fosfatidilcolina-[¹⁴ C]oleoil	47
3.2.2. Efeito da temperatura na formação de fosfatidilcolina- [¹⁴ C]oleoil	47
3.2.3. Determinação dos parâmetros cinético-enzimáticos $K_{m_{app}}$ e $V_{max_{app}}$, para lisofosfatidilcolina aciltransferase	49
3.3. Determinação da atividade da colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase em sementes de soja, produzidas em temperaturas de 34/28 e 22/13 °C – dia/noite	50
4. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
CAPÍTULO III	61
EFEITO DA TEMPERATURA NA EXPRESSÃO DO GENE QUE CODIFICA COLINAFOSFOTRANSFERASE EM SEMENTES DE SOJA	61
1. INTRODUÇÃO	61
2. MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1. Material genético	65
2.2. Extração de RNA total	66
2.3. Síntese da primeira fita de cDNA	67
2.4. Construção dos oligonucleotídeos específicos	68
2.5. Amplificação e separação dos fragmentos RT-PCR	69
2.6. Análise da expressão por <i>Northern Blot</i>	79
2.6.1. Marcação da sonda	71
2.6.2. Hibridização	72
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4. CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
CONCLUSÃO GERAL	83

LISTA DE QUADROS

	Página
CAPÍTULO I	
1. Estádios de desenvolvimento, idade cronológica, conteúdo e composição do óleo das sementes de soja da variedade CAC-1, crescidas à temperatura de 34/28 °C (dia/noite)	18
2. Estádios de desenvolvimento, idade cronológica, conteúdo e composição do óleo das sementes de soja da variedade CAC-1, crescidas à temperatura de 22/13 °C (dia/noite)	18
3. Estádios de desenvolvimento, idade cronológica, conteúdo e composição do óleo das sementes de soja da linhagem CC4, crescidas à temperatura de 34/28 °C (dia/noite)	19
4. Estádios de desenvolvimento, idade cronológica, conteúdo e composição do óleo das sementes de soja da linhagem CC4, crescidas à temperatura de 22/13 °C (dia/noite)	19
5. Valores e significâncias dos quadrados médios (QM), médias e coeficientes de variação experimental obtidos das análises de variância do delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se variedade comercial (CAC-1) e uma isolinha dela derivada (CC4), com relação aos teores dos ácidos palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico	23

CAPÍTULO II

1. Parâmetros cinéticos $K_{m_{app}}$ e $V_{max_{app}}$, para formação de fosfatidil[^{14}C]colina catalisada pela colinafosfotransferase de sementes de soja, obtida por meio de regressão não-linear, utilizando-se o programa de computação Enzifitter (LEATHERBARROW, 1987) 46
2. Parâmetros cinéticos $K_{m_{app}}$ e $V_{max_{app}}$, para formação de fosfatidilcolina-[^{14}C]oleoil catalisada pela lisofosfatidilcolina aciltransferase de sementes de soja, obtida por meio de regressão não-linear, utilizando-se o programa de computação Enzifitter (LEATHERBARROW, 1987) 50
3. Atividade específica da colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase em sementes de soja da variedade CAC-1 e linhagem CC4, produzidas nas temperaturas de 22/13 °C e 34/28 °C (dia/noite). As atividades foram detectadas após cinco minutos de reação a 30 °C 55

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Representação esquemática da biossíntese do óleo em plantas. O caminho biossintético de glicerolipídios, nos plastídios, é improvável de ser significativo em sementes oleaginosas em desenvolvimento. A linha tracejada entre DAGs (diacilgliceróis) plastidiais e extraplastidiais denota troca de glicerolipídeos entre os dois compartimentos por mecanismo(s) desconhecido(s). Mutantes nos passos de dessaturações, em <i>Arabidopsis</i> , são indicados. CPT – colinafosfotransferase, LPCAT – lisofosfatidilcolina aciltransferase e DAGAT – diacilglicerol aciltransferase (YADAV, 1996)	2
CAPÍTULO I	
1. Teor de ácido linolênico no óleo das sementes da variedade CAC-1 e da linhagem CC4, cultivadas em alta temperatura (at) – 34/28 °C (dia/noite) e em baixa temperatura (bt) – 22/13 °C (dia/noite). Estádios de desenvolvimento da semente de soja: 1 ^o – 0 a 75 mg, 2 ^o – 76 a 150 mg, 3 ^o – 151 a 225 mg, 4 ^o – 226 a 300 mg, 5 ^o – 301 a 375 mg, 6 ^o – 376 a 450 mg e 7 ^o – semente madura	22
CAPÍTULO II	
1. Esquema do uso de acil-CoA na síntese de triacilgliceróis em sementes oleaginosas em desenvolvimento. DAG – diacilgliceróis, CPT – colinafosfotransferase, LPCAT – lisofosfatidilcolina aciltransferase e G3P – glicerol 3 fosfato	30

2. Curva de tempo para formação de fosfatidil^[14C]colina, catalisada pela colinafosfotransferase de sementes de soja. Condições experimentais: tampão Tricina-KOH $6 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$, pH 8,0; CDP-colina $4 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$; e CDP-^[14C]colina $4 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$. Quantidade de extrato microsomal: 80,5 L. Concentração de proteína total no extrato microsomal: 1,28 mg/mL. O experimento foi conduzido a 30 °C 44
3. Efeito da temperatura sobre a formação de fosfatidil^[14C]colina, catalisada pela colinafosfotransferase de sementes de soja. Condições experimentais: tampão Tricina-KOH $6 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$, pH 8,0; CDP-colina $4 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$; e CDP-^[14C]colina $4 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$. Quantidade de extrato microsomal: 85,1 L. Concentração de proteína total no extrato microsomal: 1,21 mg/mL. A mistura reacional foi incubada por cinco minutos 44
4. Gráfico de Michaelis-Menten para formação de fosfatidil^[14C]colina, catalisada pela colinafosfotransferase de sementes de soja. Condições experimentais: tampão Tricina-KOH $6 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$, pH 8,0; CDP-colina 0,25 a $128 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$; e CDP-^[14C]colina $4 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$. Quantidade de extrato microsomal: 66,3 L. Concentração de proteína total no extrato microsomal: 1,60 mg/mL. O experimento foi conduzido a 30 °C, durante cinco minutos. A linha contínua foi traçada com base em pontos teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten, para obtenção de K_{mapp} e V_{maxapp} . Os pontos são experimentais. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk 46
5. Curva de tempo para formação de fosfatidilcolina-^[14C]oleoil, catalisada pela lisofosfatidilcolina aciltransferase de sementes de soja. Condições experimentais: tampão fosfato de potássio $1 \times 10^{-1} \text{ molL}^{-1}$, pH 7,2; oleoil-CoA $1,6 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$; e ^[14C]oleoil-CoA $3,4 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$. Quantidade de extrato microsomal: 77,4 L. Concentração de proteína total no extrato microsomal: 1,55 mg/mL. O experimento foi conduzido a 30 °C 48
6. Efeito da temperatura sobre a formação de fosfatidilcolina-^[14C]oleoil, catalisada pela lisofosfatidilcolina aciltransferase de sementes de soja. Condições experimentais: tampão Tricina-KOH $6 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$, pH 8,0; CDP-colina $4 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$; e CDP-^[14C]colina $4 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$. Quantidade de extrato microsomal: 92,3 L. Concentração de proteína total no extrato microsomal: 1,30 mg/mL. A mistura reacional foi incubada por um período de cinco minutos 48

7. Gráfico de Michaelis-Menten para formação de fosfatidilcolina- $[^{14}\text{C}]$ oleoil, catalisada pela lisofosfatidilcolina aciltransferase de sementes de soja. Condições experimentais: tampão fosfato $1 \times 10^{-1} \text{ molL}^{-1}$, pH 7,2; oleoil-CoA 2 a $1.600 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$; $[^{14}\text{C}]$ oleoil-CoA $3,4 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$; e palmitoil-lisofosfatidilcolina $1 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$. Quantidade de extrato microsomal: 45,5 L. Concentração de proteína total no extrato microsomal: 2,64 mg/mL. O experimento foi conduzido a 30 °C, durante cinco minutos. A linha contínua foi traçada com base em pontos teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten, para obtenção de $K_{m_{app}}$ e $V_{max_{app}}$. Os pontos são experimentais. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk 49
8. Atividade da colinafosfotransferase de sementes de soja dos genótipos CAC-1 (a) e CC4 (b). As plantas foram cultivadas nas temperaturas de 34/28 °C e 22/13 °C (dia/noite). Estádios de desenvolvimento das sementes, com base no peso fresco: 1^o – 0 a 75 mg, 2^o – 76 a 150 mg, 3^o – 151 a 225 mg, 4^o – 226 a 300 mg, 5^o – 301 a 375 mg e 6^o - 376 a 450 mg 52
9. Atividade da lisofosfatidilcolina aciltransferase de sementes de soja dos genótipos CAC-1 (a) e CC4 (b). As plantas foram cultivadas nas temperaturas de 34/28 °C e 22/13 °C (dia/noite). Estádios de desenvolvimento da semente, com base no peso fresco: 1^o – 0 a 75 mg, 2^o – 76 a 150 mg, 3^o – 151 a 225 mg, 4^o – 226 a 300 mg, 5^o – 301 a 375 mg e 6^o – 376 a 450 mg 53
- CAPÍTULO III
1. Amplificação do cDNA da colinafosfotransferase pela técnica de RT-PCR. As linhas 1, 1', 6 e 6' correspondem ao cDNA da colinafosfotransferase de semente de soja da linhagem CC4 e da variedade CAC-1 no primeiro e sexto estádios de desenvolvimento, produzidas nas temperaturas de 34/28 e 22/13 °C (dia/noite), respectivamente 73

2. **A)**: auto-radiografia da análise de *Northern Blot* para a sonda AAPT1. A membrana foi hibridizada com a sonda AAPT1, marcada com [-P³²]dATP, em condições de baixa estrigência. O tamanho aproximado da banda acima é de 188 pb. Em ambas as figuras, os números de 1 a 5 correspondem ao RNA total extraído de sementes de plantas do genótipo CC4, nos cinco estádios de desenvolvimento, cultivado em alta temperatura (34/28 °C – dia/noite); e de 1' a 5', cultivado em baixa temperatura (22/13 °C – dia/noite). Os números de 7 a 12 correspondem ao RNA total de plantas do genótipo CAC-1, cultivado em alta temperatura; e de 7' a 12', cultivado em baixa temperatura. Estádios de desenvolvimento da semente de soja, com base no peso fresco da semente: 1^o – 0 a 75 mg, 2^o – 76 a 150 mg, 3^o – 151 a 225 mg, 4^o – 226 a 300 mg, 5^o – 301 a 375 mg e 6^o – 376 a 450 mg. **B)**: análise eletroforética em gel desnaturante de agarose 1,2% do RNA total extraído de sementes da variedade CAC-1 e da linhagem CC4

74

RESUMO

LANNA, Anna Cristina, D. S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2002.
Efeito da temperatura sobre a regulação da síntese de ácidos graxos polinsaturados em soja. Orientador: Maurílio Alves Moreira. Conselheiros: Maria Goreti de Almeida Oliveira e Everaldo Gonçalves de Barros.

A soja é uma leguminosa de grande importância socioeconômica por apresentar grandes quantidades de proteína e óleo em seu grão. O óleo de soja é o líder mundial dos óleos consumidos no mundo, no entanto apresenta alta porcentagem de ácidos graxos polinsaturados, nominalmente ácido linoléico (18:2) e ácido linolênico (18:3), responsáveis, em grande parte, pela baixa estabilidade oxidativa do óleo. Linhagens de soja com baixo teor de ácido linolênico já estão sendo obtidas, porém a variação no teor de ácidos graxos polinsaturados nessas linhagens, em razão da temperatura de crescimento e do desenvolvimento das plantas, é um sério problema que os programas de melhoramento estão enfrentando. No presente trabalho, foram utilizadas linhagens de soja quase-isogênicas que se contrastam com relação ao teor do ácido linolênico: CAC-1, variedade comercial com teor normal do ácido linolênico; e CC4, linhagem mutante com baixo teor desse ácido. Foram avaliados: teor do ácido linolênico, atividade das enzimas colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase e nível de regulação da colinafosfotransferase em sementes produzidas em duas condições de

temperatura: 34/28 e 22/13 °C – dia/noite. Na análise da variação do teor do ácido linolênico, a linhagem mutante (CC4) apresentou-se mais estável diante das temperaturas de crescimento e desenvolvimento das plantas, ou seja, a variação do teor de ácido linolênico foi de apenas 3%, chegando a 5% na variedade comercial (CAC-1), apesar de ter ocorrido variação semelhante no teor de ácidos graxos polinsaturados, nos genótipos estudados. Com relação às enzimas que enriquecem o *pool* de acil-CoA citoplasmático com ácidos graxos polinsaturados, denominadas colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase, verificou-se que ambas são mais ativas quando as plantas de soja cresceram em baixa temperatura (22/13 °C – dia/noite). Isso indica a participação das duas enzimas no aumento do nível de ácidos graxos polinsaturados para a biossíntese do óleo, em condições de baixas temperaturas. A colinafosfotransferase é uma enzima-chave no metabolismo de lipídeos, uma vez que produz tanto os lipídeos estruturais de membrana quanto os de reserva. Portanto, pela sua importância na fisiologia da semente e pelo fato de ter sido detectado alta atividade em baixa temperatura, ficou evidente a necessidade de entender sua regulação. A análise de *Northern blot* evidenciou que seu controle não é em nível transcricional, não havendo diferença de acúmulo de transcritos da colinafosfotransferase quando mRNAs de sementes produzidas a 34/28 e 22/13 °C foram analisados.

ABSTRACT

LANNA, Anna Cristina, D. S., Universidade Federal de Viçosa, March, 2002.
Effect of temperature on polyunsaturated fatty acid synthesis in soybean seeds. Adviser: Maurílio Alves Moreira. Committee members: Maria Goreti de Almeida Oliveira and Everaldo Gonçalves de Barros.

Soybean, with its high protein and oil contents, is a legume crop of great social and economic importance. Worldwide, soybean oil occupies the top position among consumable oils, in spite of its high percentage of polyunsaturated fatty acids, mainly linoleic (18:2) and linolenic acid (18:3), which are, to a great extent, responsible for the low oxidative stability of the soybean oil. Soybean lines with low linolenic acid contents are currently being genetically bred, although the dependence of temperature of growth and plant development impose remarkable obstacles for breeding purposes. Two soybean lines were used in our study. CAC-1, a normal linolenic acid content variety (around 9 to 10%) and CC4 a near isogenic line with low content of this fatty acid (about 3%). In this work, fatty acid composition, choline phosphotransferase and lysophosphatidylcholine acyltransferase enzymes activities, and the regulation of the choline phosphotransferase in seeds produced under high and low temperature conditions (34/22 °C and 28/13 °C day/night) were investigated. With regard to linolenic acid content, CC4 line proved to be more stable when was grown under low temperature. However,

similar variations pattern for fatty acid contents were observed among both lines. In relation to the enzymes choline phosphotransferase and lysophosphatidylcholine acyltransferase that enrich the acyl-CoA cytoplasmic pool with polyunsaturated fatty acids, higher activities of both were observed when the soybean plants were grown at low temperatures (22 °C/13 °C day/night). These results suggest that at low temperatures, the two enzymes are activated and both contribute to raise the polyunsaturated fatty acid level which are used in the biosynthesis of the oil fraction. The choline phosphotransferase is a key-enzyme in the lipid metabolism, since it catalyze the production of both membrane as well as storage lipids. The observation that this enzyme showed high activity at low temperatures led us to investigate the level of its regulation. The regulation of the enzyme activity does not seem to occur at the transcriptional level as shown by Northern blot analysis. There was no detectable difference in transcript accumulation in seeds grown at high (34/22 °C) as compared to low (28/13 °C) temperatures.

INTRODUÇÃO GERAL

Em células vegetais, a biossíntese de lipídeos envolve dois estádios que se sobrepõem: a biossíntese de ácidos graxos, juntamente com a produção dos lipídeos estruturais das membranas plastidiais; e a síntese de triacilgliceróis, concomitantemente com a produção dos lipídeos estruturais das membranas extraplastidiais (Figura 1). Enzimas plastidiais são responsáveis pela biossíntese de ácidos graxos a partir de precursores acetil-CoA; a partir daí, ocorre uma bifurcação em dois diferentes caminhos: um no retículo endoplasmático liso (caminho “eucariótico”) e o outro no plastídio (caminho “procariótico”), levando a diferentes produtos. No mínimo, 30 reações enzimáticas têm sido identificadas; algumas são comuns em ambos os compartimentos, ao passo que outras são específicas de cada organela (MEKLEDOV et al., 2000).

A primeira seqüência de reações, ou seja, a biossíntese dos ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e oléico (C18:1), no interior do plastídio, é catalisada pela ácido graxo sintase. Em células vegetais, a ácido graxo sintase é um complexo multienzimático que tem como função adicionar unidades de dois carbonos a cada ciclo até formar o palmitoil-ACP (ACP – proteína carreadora de grupamentos acil). Esse complexo é constituído de quatro enzimas: β -cetoacil-ACP sintase (KAS), β -cetoacil-ACP redutase, β -hidroxiacil-ACP desidratase e enoil-ACP redutase (YADAV, 1996), as quais são polipeptídeos individuais e, portanto, permitem alterações na estequiometria das reações catalisadas pelo uso de diferentes isoenzimas em diversos tipos de células e diferentes substratos (SOMERVILLE e BROWSE, 1991).

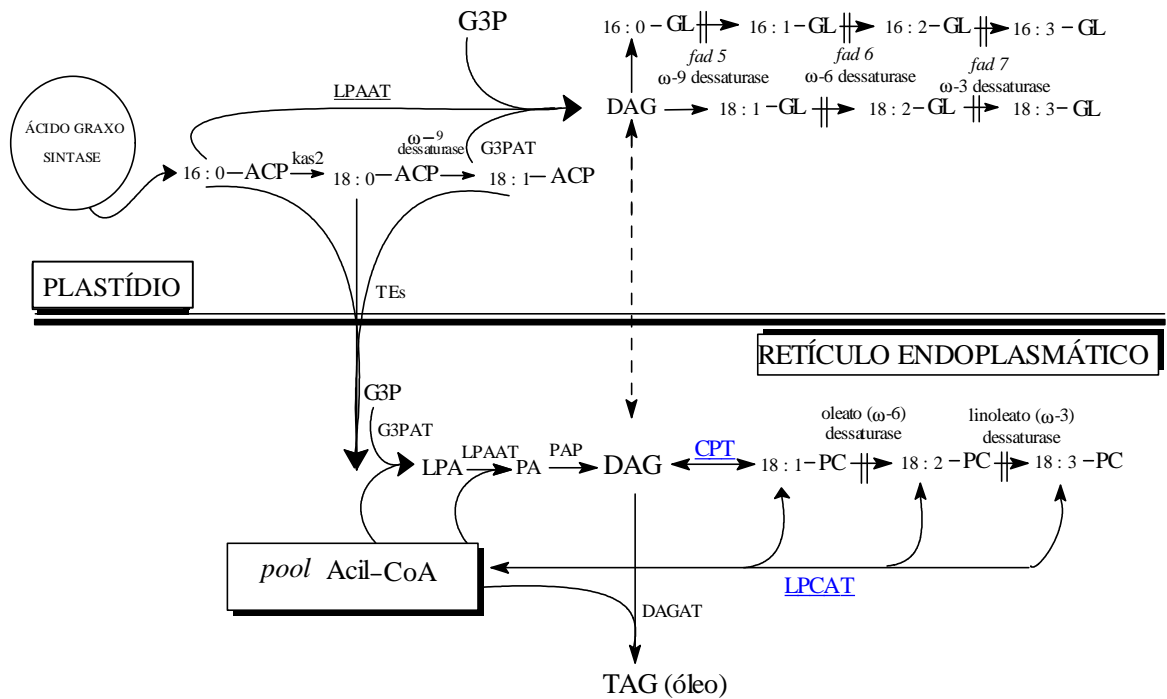


Figura 1 – Representação esquemática da biossíntese do óleo em plantas. O caminho biossintético de glicerolipídios, nos plastídios, é improvável de ser significativo em sementes oleaginosas em desenvolvimento. A linha tracejada entre DAGs (diacilgliceróis) plastidiais e extraplastidiais denota troca de glicerolipídeos entre os dois compartimentos por mecanismo(s) desconhecido(s). Mutantes nos passos de dessaturações, em *Arabidopsis*, são indicados. CPT – colinafosfotransferase, LPCAT – lisofosfatidilcolina aciltransferase e DAGAT – diacilglicerol aciltransferase (YADAV, 1996).

Para alongação do palmitoil-ACP a estearoil-ACP, a enzima requerida é a β -cetoacil sintase II (KAS II), a qual ocorre na forma de isoenzimas. A isoenzima III parece iniciar a síntese da cadeia acil, a isoenzima I alonga a cadeia acil para palmitoil-ACP e a isoenzima II é especificamente requerida para alongação de palmitoil-ACP para estearoil-ACP (SOMERVILLE e BROWSE, 1991).

A conversão do estearoil-ACP em oleoil-ACP é catalisada pela estearoil-ACP dessaturase ou δ -9 dessaturase, a única dessaturase solúvel conhecida que introduz a primeira dupla ligação e requer O_2 /ferredoxina reduzida como doadores de elétrons. Pelo fato de essa enzima não dessaturar palmitoil-ACP, o controle da alongação de palmitoil-ACP a estearoil-ACP é um ponto-chave

em determinar o nível de ácidos graxos saturados encontrados tanto nos lipídeos de membrana quanto nos de reserva (SOMERVILLE e BROWSE, 1991).

Palmitoil-ACP, estearoil-ACP e oleoil-ACP podem servir como substrato para as transferases, como também para as tioesterases, ou seja, estes compostos podem permanecer no plastídio para síntese dos lipídeos estruturais de membranas cloroplastidiais, como também podem ser exportados para o citosol para produção do óleo de reserva e lipídeos estruturais de membranas extracloroplastídicas. Os ácidos graxos liberados, pelas tioesterases, são exportados como acil-CoA (CoA – coenzima A) para o citoplasma. Portanto, ácidos graxos polinsaturados podem ser sintetizados no retículo endoplasmático e, ou, no plastídio. Em ambos, a biossíntese do ácido linoléico (C18:2) e do ácido linolênico (C18:3) é catalisada pela oleoil e linoleoil dessaturase, respectivamente. As dessaturases plastidiais catalisam reações dependentes de O₂, tendo como substrato primário os galactolipídeos, especialmente monogalactosil-diacilglicerol e digalactosildiacilglicerol, e utilizam como doador de elétrons ferredoxina, enquanto as dessaturases microssomais usam como doador de elétrons o citocromo b₅ e, como substrato primário, a fosfatidilcolina (YADAV, 1996; SHANKLIN e CAHOON, 1998; LOS e MURATA, 1998).

Ambos os caminhos operam nos tecidos foliares com significativas trocas entre os intermediários dos dois caminhos, enquanto a via do retículo endoplasmático predomina durante a biossíntese do óleo em sementes em desenvolvimento e em outros tecidos não-fotossintetizantes (YADAV, 1996).

Durante a biossíntese de triacilgliceróis, no retículo endoplasmático ocorre adição seqüencial de grupamentos acil nas posições 1 e 2 do glicerol-3-fosfato, catalisada pela glicerol-3-P aciltransferase, resultando na síntese do ácido fosfatídico. Este, por sua vez, é convertido em diacilglicerol (DAG) pela ácido fosfatídico fosfatase. Diacilgliceróis são um ponto de ramificação para a biossíntese de lipídeos de membrana ou de reserva. Por exemplo, para a biossíntese de lipídeos de membrana, diacilgliceróis podem ser, reversivelmente, convertidos em fosfatidilcolina pela colinafosfotransferase. Fosfatidilcolina serve como substrato para a biossíntese de ácidos graxos polinsaturados, os quais podem retornar ao *pool* de acil-CoA citoplasmático

pela ação da lisofosfatidilcolina transferase. No entanto, o DAG pode sofrer acilação final na posição 3 da molécula de glicerol para formar triacilgliceróis (TAG); essa reação é catalisada pela diacilglicerol aciltransferase (YADAV, 1996).

Os níveis do ácido linoléico e do ácido linolênico no óleo dependem tanto das taxas de biossíntese quanto de suas disponibilidades para a biossíntese do óleo. Existem dois mecanismos pelos quais a disponibilidade de ácidos graxos polinsaturados pode ocorrer: (a) reação reversível da colinafosfotransferase, a qual converte fosfatidilcolina contendo ácidos graxos polinsaturados em DAG, que pode ser utilizado para a biossíntese do óleo via diacilglicerol aciltransferase; e (b) reação reversível da lisofosfatidilcolina aciltransferase, cuja função é catalisar a troca de grupamentos acil, geralmente entre oleoil-CoA e um grupo acil polinsaturado da posição 2 da fosfatidilcolina. Isso resulta no enriquecimento do *pool* de acil-CoA com ácidos graxos polinsaturados para uso na biossíntese do óleo (YADAV, 1996).

A composição de ácidos graxos nos triacilgliceróis é espécie e, freqüentemente, variedade específica. As proporções relativas dos ácidos graxos constituintes dos triacilgliceróis também diferem consideravelmente (ROUGHAN e SLACK, 1982).

Os triacilgliceróis estão presentes, nas células, em pequenas e discretas organelas intracelulares, denominadas corpos lipídicos. Estes são constituídos de uma matriz de triacilgliceróis circundada por uma camada de fosfolipídeos. Por toda a superfície do corpo lipídico, encontra-se uma proteína denominada oleosina, que interage com e cobre toda a camada de fosfolipídeos e a matriz de triacilgliceróis. Ela forma uma espécie de barreira, impedindo que a camada de fosfolipídeos dos corpos lipídicos adjacentes se coalesçam. A carga líquida das oleosinas, exposta ao citossol, é negativa, ocorrendo repulsão eletrostática entre os corpos lipídicos (TZEN e HUANG, 1992).

Em adição ao papel estrutural, as oleosinas podem servir como receptores (sinais de identificação) nas superfícies dos corpos lipídicos para a ligação das lipases sintetizadas *de novo* durante a germinação. Pelo fato de serem muito pequenos, os corpos lipídicos fornecem grande área superficial por unidade de triacilglicerol, o que poderia facilitar a ligação de lipases e posterior hidrólise durante a germinação (HUANG, 1996).

Durante o desenvolvimento da semente, os corpos lipídicos são sintetizados, no retículo endoplasmático, por um processo denominado vesiculação. Triacilgliceróis são sintetizados e encapsulados por uma camada de fosfolípidos também formados nas membranas do retículo endoplasmático, gerando uma vesícula. Simultaneamente, oleosinas são sintetizadas nos polirribossomos ligados ao retículo endoplasmático sem apreciável processamento co ou pós-traducional. Dessa forma, as oleosinas movem-se para as partículas de TAGs em desenvolvimento, guiadas, presumivelmente, por um domínio central hidrofóbico (HUANG, 1996).

A composição e a distribuição dos ácidos graxos em uma molécula de triacilglicerol determinam a qualidade do óleo, o valor nutricional, o sabor e propriedades físicas, como a estabilidade oxidativa. O alto teor de ácidos graxos polinsaturados é responsável pela redução da estabilidade à oxidação e da qualidade (sabor e odor) do óleo de soja (ALONSO e MAROTO, 2000). O processamento industrial utilizado para que haja maior estabilidade oxidativa no óleo de soja é a hidrogenação química (KINNEY, 1996). Isso reduz, substancialmente, o conteúdo de ácidos graxos polinsaturados; no entanto, além de reduzir o atrativo econômico de se usar a fração óleo de soja, gera quantidades significativas de isômeros trans de ácidos graxos, principalmente o ácido transoléico (YADAV, 1996).

Mutações gênicas que levam à redução no conteúdo de ácido linolênico nos triacilgliceróis das sementes têm sido identificadas em linho, canola e soja. Tanto o milho quanto o girassol parecem ser, naturalmente, deficientes na linoleoil dessaturase, porque o conteúdo do ácido linolênico é negligenciável (1% ou menos do conteúdo de ácidos graxos nos TAGs) (KINNEY, 1994).

Nas últimas décadas, o desenvolvimento da genética de biossíntese de ácidos graxos em plantas tem propiciado a clonagem de genes, ressaltando-se que os primeiros a serem clonados foram das enzimas plastidiais: -ceto acil-ACP sintase, -9 dessaturase e tioesterases. Entretanto, as enzimas extracloroplastídicas, envolvidas na biossíntese dos lipídeos de reserva e estruturais, são proteínas integrais da membrana do retículo endoplasmático e, portanto, mais difíceis de serem purificadas e estudadas. Felizmente, abordagens genéticas estão fornecendo subsídios para a clonagem de alguns desses genes, por exemplo oleato e linoleato dessaturases, ácido

lisofosfatídico aciltransferase e colinafosfotransferase. Conseqüentemente, mutantes de soja e de outras culturas, economicamente importantes, com composição de ácidos graxos modificada, estão sendo obtidos. Os mutantes são úteis tanto como material de melhoramento quanto como ferramenta para estudar a regulação da biossíntese do óleo (YADAV, 1996).

O Programa de Melhoramento Genético da Qualidade de Óleo e Proteína da Soja conduzido na Universidade Federal de Viçosa, visando desenvolver linhagens especiais de soja para a agroindústria, criou um valioso germoplasma, que inclui, dentre outras, linhagens com baixos teores de ácido linolênico. Dentro desse contexto, a principal meta desse programa é aumentar a estabilidade oxidativa do óleo pela redução do conteúdo de ácido linolênico e pelo aumento do conteúdo de ácido oléico (MOREIRA, 1999). Este ácido não é estável como os ácidos graxos saturados, entretanto é cerca de 10 vezes mais estável que o ácido linoléico e, pelo menos, 20 vezes mais que o linolênico (ECONOMIC, 1990).

Níveis de ácidos graxos polinsaturados, especialmente do ácido linolênico, aumentam em plantas quando estas são expostas a baixas temperaturas (KODAMA et al., 1995). Alterações nos níveis de insaturações dos ácidos graxos, induzidas por baixa temperatura, são explicadas em termos de regulação da fluidez de membrana, o que é necessário para o adequado funcionamento das membranas biológicas (MURATA e WADA, 1995).

De acordo HAMADA et al. (1998), estudos usando mutantes de *Arabidopsis* com composição alterada de glicerolípídeos têm evidenciado que ácidos graxos polinsaturados são requeridos para o crescimento e tolerância das plantas em baixas temperaturas, porém não-congelantes. Por exemplo, os mutantes *fad 5* e *fad 6*, os quais são deficientes nos passos de dessaturação que ocorrem no plastídio, apresentaram clorose foliar, redução das taxas de crescimento e enfraquecimento no desenvolvimento de cloroplastos (HUGLY e SOMERVILLE, 1992). No entanto, o mutante *fad 2*, deficiente nos passos de dessaturação que ocorrem no retículo endoplasmático, apresentou aumento de injúrias pelo frio, como inibição da alongação do caule a 12 °C e perda de viabilidade a 6 °C (MIQUEL et al., 1993).

O mecanismo pelo qual a temperatura induz o aumento de ácidos graxos polinsaturados não está totalmente conhecido; porém, parece que o

efeito é mais pronunciado em linhagens mutantes do que em linhagens normais (KINNEY, 1994).

De posse de linhagens quase-isogênicas que contrastam para teor de ácido linolênico na fração óleo, este trabalho teve como objetivo esclarecer, em nível bioquímico-molecular, a regulação dos níveis de ácidos graxos polinsaturados no óleo de soja em plantas crescidas em duas condições de temperatura: 34/28 e 22/13 °C (dia/noite). Para isso, foram utilizados os genótipos CAC-1, variedade comercial com nível normal de ácido linolênico (8%); e CC4, linhagem mutante derivada do cultivar CAC-1, que apresenta baixo teor desse ácido (4%).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, D. L.; MAROTO, F. G. Plants as “chemical factories” for the production of polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 481-497, 2000.
- ECONOMIC implications of modified soybean traits. Ames, Iowa: Iowa Soybean Promotion Board, American Soybean Association, 1990. 88 p. (Special Report, 92).
- HAMADA, T.; KODAMA, H.; TAKESHITA, K.; UTSUMI, H.; IBA, K. Characterization of transgenic tobacco with an increased α -linolenic acid level. **Plant Physiology**, v. 118, p. 591-598, 1998.
- HUANG, A. H. C. Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. **Plant Physiology**, v. 110, p. 1055-1061, 1996.
- HUGLY, S.; SOMERVILLE, C. A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature. **Plant Physiology**, v. 99, p. 197-202, 1992.
- KINNEY, A. J. Genetic modification the storage lipids of plants. **Currents Opinion in Biotechnology**, v. 5, p. 144-151, 1994.
- KINNEY, A. J. Development of genetically engineered soybean oils for food applications. **Journal of Food Lipids**, v. 3, p. 273-292m, 1996.
- KODAMA, H.; HAMADA, T.; HORIGUCHI, G.; NISHIMURA, M.; IBA, K. Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast α -3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. **Plant Physiology**, v. 105, p. 601-605, 1994.

- LOS, D. A.; MURATA, N. Structure and expression of fatty acid desaturases. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1394, p. 3-15, 1998.
- MIQUEL, M.; JAMES JR., D.; DONNER, H.; BROWSE, J. *Arabidopsis* require polyunsaturated lipids for low-temperature survival. **Proceedings of the National Academy Science – USA**, v. 90, p. 6208-6212, 1993.
- MOREIRA, M. A. Programa de melhoramento genético da qualidade de óleo e proteína da soja desenvolvido na UFV. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina, PR: Embrapa – Soja, Londrina-Paraná, 1999. p. 99-104.
- MEKHEDOV, S.; ILÁRDUYA, M.; OHLROGGE, J. Toward a functional catalog of the plant genome. A survey of genes for lipid biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 122, p. 389-402, 2000.
- MURATA, N.; WADA, H. Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. **Biochemistry Journal**, n. 308, p. 1-8, 1995.
- ROUGHAN, P. G.; SLACK, C. R. Cellular organization of glycerolipid metabolism. **Annual Review Plant Physiology**, n. 33, p. 97-132, 1982.
- SHANKLIN, J.; CAHOON, E. B. Desaturation and related modifications of fatty acids. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, n. 49, p. 611-641, 1998.
- SOMERVILLE, C.; BROWSE, J. Plant Lipids: metabolism, mutants and membranes. **Science**, n. 252, p. 80-87, 1991.
- TZEN, J. T. C.; HUANG, A. H. C. Surface structure and properties of plant seed oil bodies. **The Journal of Cell Biology**, n. 117, p. 327-335, 1992.
- YADAV, N. S. Genetic modification of soybean oil quality. In: VERMA, D. P. S.; SHOEMAKER, R. C. (Eds.). **Soybean genetics, molecular biology and biotechnology**. USA: CAB INTERNATIONAL, 1996. p. 127-188.

CAPÍTULO I

EFEITO DA TEMPERATURA NO CONTEÚDO DE ÓLEO E DE ÁCIDOS GRAXOS DO GRÃO DE SOJA DURANTE O SEU ENCHIMENTO

1. INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais constituem um dos principais produtos derivados da agricultura, sendo o óleo de soja o líder mundial, responsável por 20 a 24% de todas as gorduras e óleos consumidos no mundo. No Brasil, o óleo de soja contabiliza bem acima dos 50% de todos os óleos e gorduras dos produtos alimentícios (MOREIRA, 1999). Além disso, é o que apresenta menor custo de produção, visto que é um co-produto do farelo de soja (alimento rico em proteínas) (YADAV, 1996).

A soja é a única, entre as leguminosas, que possui alto teor de óleo e proteína (KINNEY, 1996), componentes que representam mais de 50% do peso seco total da semente (RUBEL et al., 1972). Na maturidade fisiológica, a soja contém cerca de 21% de óleo, 40% de proteína, 34% de carboidratos e 5% de cinzas (BURTON, 1997), embora cultivares com menos de 18% de óleo ou mais de 50% de proteína possam ser encontrados (YADAV, 1996).

O óleo é composto de triacilgliceróis, os quais são constituídos de três ácidos graxos, iguais ou diferentes entre si, esterificados a uma molécula de glicerol. A composição e distribuição dos ácidos graxos, na molécula de

triacilglicerol, determinam a qualidade do óleo – valor nutricional, *flavour* e propriedades físicas, como estabilidade oxidativa e ponto de fusão. O óleo de soja, como a maioria dos óleos comestíveis, é composto, principalmente, por cinco ácidos graxos: ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1), ácido linoléico (18:2) e ácido linolênico (18:3). Os ácidos palmítico e esteárico são ácidos graxos saturados contendo 16 e 18 átomos de carbono, respectivamente. Os ácidos oléico, linoléico e linolênico são ácidos graxos insaturados de 18 carbonos contendo uma, duas e três duplas ligações *cis* interrompidas por um grupo metileno, respectivamente. As posições das duplas ligações na cadeia acila a partir da extremidade carboxila são -9 em 18:1, -9 e 12 (ou -6, contando a partir da extremidade metila) em 18:2 e -9 e -12 (ou -6) e -15 (ou -3) em 18:3; 18:1 é também referido como ácido graxo monoinsaturado, enquanto 18:2 e 18:3 são também considerados ácidos graxos polinsaturados (YADAV, 1996).

Os mesmos ácidos graxos encontrados no óleo são também os principais constituintes das membranas biológicas, afetando a sua fisiologia e o desenvolvimento da planta como um todo. Portanto, ácidos graxos são sintetizados em todas as células, e sua síntese deve ser rigidamente controlada, de forma a balancear a oferta e a demanda por grupamentos acilas. A necessidade da síntese pode ser altamente variável, dependendo do estágio de desenvolvimento, da hora do dia ou da taxa de crescimento. Além disso, em alguns tipos de células a demanda pela síntese de ácidos graxos é substancialmente maior; exemplos disso são as sementes oleaginosas, que durante o desenvolvimento chegam a acumular cerca de 60% do seu peso, como triacilgliceróis (OHROGGE e JAWORSKI, 1997).

O óleo de soja, normalmente, consiste de 11% de ácido palmítico, 4% de ácido esteárico, 24% de ácido oléico, 54% de ácido linoléico e 7% de ácido linolênico, com a ressalva de que os polinsaturados perfazem a maior parte (KINNEY, 1996). Em decorrência desse fato, a qualidade do óleo de soja não é ideal para fins industriais, principalmente por causa da sua baixa estabilidade oxidativa. Atualmente, o processamento industrial utilizado para que haja maior estabilidade oxidativa no óleo de soja é a hidrogenação química (HILDEBRAND e COLLINS, 1998). Esse processo diminui substancialmente o conteúdo de ácidos graxos polinsaturados, no entanto, além de reduzir o

atrativo econômico de se usar a fração óleo de soja, gera quantidades significativas de ácidos graxos saturados e de isômeros trans de ácidos graxos, principalmente o ácido transoléico. O consumo desses compostos está relacionado com doenças cardíacas (Yadav, 1996, citado por GESTEIRA, 1997, e MORAES, 1999).

Pelo fato de essa composição de ácidos graxos não ser adequada, existe considerável interesse em modificar a composição do óleo por melhoramento tradicional ou pelo uso de novas técnicas de biologia molecular. Para tanto, modificações genéticas na composição do óleo de culturas oleaginosas, para produzirem óleos com atributos nutricionais e funcionais desejáveis, já estão sendo obtidas em vários laboratórios (WANG e HILDEBRAND, 1988; OSÓRIO et al., 1995; KINNEY, 1996). De acordo com MOUNTS et al. (1994), óleos com reduzido teor de ácido linolênico, produzidos a partir de linhagens com baixo teor desse ácido, foram mais eficientes em minimizar o sabor desagradável (*off-flavour*) em alimentos fritos quando comparados com o óleo comercial hidrogenado.

O conteúdo relativo de ácidos graxos polinsaturados é altamente dependente da temperatura durante o crescimento da semente (OSÓRIO et al., 1995), e, de acordo com HAMMOND e FEHR (1984), associada à variação ambiental, existe também variação na composição de ácidos graxos entre sementes de uma mesma planta e entre plantas de um mesmo genótipo.

Uma relação inversa se verifica entre o aumento na quantidade de ácidos graxos polinsaturados e o decréscimo da temperatura, isto é, o número de insaturação aumenta tanto nos ácidos graxos constituintes dos lipídeos de membrana quanto nos de reserva durante a diminuição da temperatura. Ácidos graxos insaturados possuem ponto de fusão mais baixo do que os ácidos graxos saturados e, assim, podem conferir maior fluidez à membrana, proporcionando a manutenção de seu funcionamento, em condições de baixa temperatura. O mesmo princípio é válido para os triacilgliceróis, ou seja, alto conteúdo de ácidos graxos polinsaturados, em condições de baixa temperatura, proporciona uma consistência líquida ao óleo presente dentro dos corpos lipídicos (HEPPARD et al., 1996).

De acordo com PORANKIEWIEZ et al. (1998), plantas e bactérias que vivem em condições de baixa temperatura aumentam o número de ácidos

graxos insaturados em seus lipídeos como um dos mecanismos de tolerância ao frio. Portanto, ao mesmo tempo que há necessidade de elevar níveis de ácidos graxos polinsaturados – porque isso é crucial para a aclimatação ao frio –; esse aumento é prejudicial para a estabilidade oxidativa dos lipídeos de reserva de culturas oleaginosas quando eles são processados (WILCOX e CAVINS, 1992).

Genótipos de soja com composição modificada de ácidos graxos estão sendo considerados para produção comercial, no entanto a estabilidade dessa composição, em uma série de condições ambientais, é um fator importante para os usuários finais dos novos óleos de soja. Com isso, os objetivos deste trabalho foram determinar: (a) o conteúdo dos ácidos palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico durante o desenvolvimento da semente de soja da variedade comercial CAC-1 (teor normal do ácido linolênico) e da linhagem mutante CC4 (baixo teor do ácido linolênico), cultivadas em duas condições de temperatura: 34/28 e 22/13 °C (dia/noite); e (b) avaliar a extensão da variabilidade na composição desses ácidos graxos, em ambos os genótipos, em decorrência da temperatura de crescimento e desenvolvimento das plantas. Tais informações serão úteis para efeito de melhoramentos quantitativo e qualitativo da fração óleo desta leguminosa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

Sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) do cultivar comercial CAC-1 e da linhagem CC4, derivada desse cultivar, foram utilizadas neste experimento. CAC-1 possui teor normal do ácido linolênico (8%) e CC4, baixo teor (3%).

A linhagem CC4 é resultante do cruzamento entre a variedade comercial CAC-1 e o acesso BARC-12. Este, com menos de 3% do ácido linolênico, foi desenvolvido pelo USDA-ARS em Beltsville, Maryland (EUA), o qual foi também cruzado com o cultivar comercial CAC-1, obtendo-se a geração F1. As plantas F1 foram autofecundadas, produzindo a geração F2. Sementes F2 selecionadas para baixo teor de ácido linolênico foram plantadas em casa de vegetação e retrocruzadas com CAC-1. Tal procedimento de retrocruzamento foi seguido de autofecundações e a seleção de sementes, realizada até o terceiro ciclo de retrocruzamento, produzindo, dessa forma, linhagens quase-isogênicas (RC3F4) de CAC-1, que apresentam baixo teor de ácido linolênico. Essas linhagens fazem parte do germoplasma do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa, visando à criação de germoplasma para sua maior aceitabilidade na alimentação humana e maior estabilidade oxidativa do óleo.

As plantas foram cultivadas no período de maio a setembro de 2000. Até o início do período reprodutivo, elas foram crescidas a uma temperatura média diária de 31 °C e, então, transferidas para duas casas de vegetação: uma com sistema de ventilação, em que a temperatura máxima média era de 22 °C e a mínima média, de 13 °C. Na outra, com sistema de aquecimento artificial, as temperaturas máxima e mínima médias foram de 34 e 28 °C, respectivamente. As medidas de temperatura, por meio de um higrômetro, foram feitas diariamente, às 17 h.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por planta, por ambiente de temperatura, totalizando 45 vasos com capacidade para 4,0 kg de solo.

As sementes foram coletadas em um período de aproximadamente três meses, separadas em seis estádios de desenvolvimento, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C, para posteriores análises.

O conteúdo de óleo e dos seus cinco ácidos graxos constituintes foi determinado nos seis estádios de desenvolvimento, os quais foram definidos com base no peso fresco da semente: 1^o – 0 a 75 mg, 2^o – 76 a 150 mg, 3^o – 151 a 225 mg, 4^o – 226 a 300 mg, 5^o – 301 a 375 mg e 6^o – 376 a 450 mg. Esses estádios compreenderam, praticamente, todo o período de enchimento do grão, com o último estágio precedendo a maturidade fisiológica da semente. No mínimo, 100 sementes por estágio foram coletadas.

Aproximadamente 8 g de sementes em desenvolvimento foram liofilizados e moídos para análise do conteúdo de óleo e 1 g o foi para análise dos teores dos ácidos palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico.

2.2. Determinação do conteúdo de óleo bruto

Óleo bruto nas sementes, em cada estágio de desenvolvimento, foi determinado em aparelho extrator de Soxhlet, utilizando-se éter de petróleo como solvente, segundo o procedimento descrito em Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985), com refluxo por 10 horas.

2.3. Obtenção dos metil-ésteres de ácidos graxos

Teores de ácidos graxos no óleo das sementes de soja foram determinados por cromatografia gasosa. Aproximadamente 150 mg de semente liofilizada e moída foram colocados em microtubos de 1,5 mL, sendo realizadas três repetições para cada estágio de desenvolvimento da semente. A cada amostra foi adicionado 1 ml de hexano, sendo a mistura mantida a 4 °C por cerca de 16 horas, sob a atmosfera de N₂. Após esse tempo, a solução de lipídeos em hexano foi transferida para outro tubo, e duas lavagens sucessivas com 0,5 mL de hexano foram feitas para extração completa do óleo. A solução de lipídeos em hexano (2 mL) foi vertida em tubos de ensaio e o solvente, evaporado por borbulhamento em N₂. Para obtenção dos ésteres metílicos, foi utilizada a metodologia descrita por JHAM et al. (1982).

Após a derivatização, alíquotas de 1 µL foram injetadas em cromatógrafo a gás GC-17A, equipado com auto-injetor AOC-17 e integrador C-R7A, marca SHIMADZU. Foram utilizadas coluna carbowax (30 m x 0,32 mm) e temperaturas de 225 °C para a coluna, 245 °C para o injetor e 280 °C para o detector. O gás de arraste foi o nitrogênio, com um fluxo de 1,1 mL/min.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura de crescimento e desenvolvimento das plantas é um fator importante na determinação da composição dos ácidos graxos constituintes dos lipídeos estruturais constituintes de membranas e dos lipídios de reserva (fração óleo) (GIBSON e MULLEN, 1996).

Os resultados obtidos nos Quadros 1, 2, 3 e 4 indicam o desenvolvimento da semente de soja da variedade comercial CAC-1 e da linhagem CC4, bem como a síntese do óleo e de seus ácidos graxos constituintes. Um indicador da idade cronológica, dias após florescimento (DAF), está incluído nesses quadros. Para estimar tal parâmetro, foram observados e anotados a data do início do florescimento e o dia referente à primeira coleta das sementes inerentes a cada estágio de desenvolvimento. Para isso, tomou-se por base a coleta aleatória das sementes no conjunto de 135 plantas.

Os seis estádios de desenvolvimento da semente de soja foram determinados com o objetivo de abranger todo o período de síntese do óleo, ou seja, todo o período de acúmulo linear de matéria seca no grão. Após o sexto estágio de desenvolvimento (sementes com até 450 mg de peso fresco), as sementes começaram a apresentar coloração amarelada, sendo, portanto, consideradas “maduras fisiologicamente”, mesmo com alto conteúdo de umidade. No sétimo estágio, as sementes apresentavam-se secas, no ponto de colheita.

Quadro 1 – Estádios de desenvolvimento, idade cronológica, conteúdo e composição do óleo das sementes de soja da variedade CAC-1, crescidas à temperatura de 34/28 °C (dia/noite)

ED	<u>Semente</u> Peso fresco mg/semente	<u>DAF</u>	<u>Óleo bruto</u> % peso seco	<u>Composição do óleo</u> %				
				16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
1	0 – 75	20	6,72	16,40	5,44	13,93	39,06	25,17
2	76 – 150	23	11,27	14,72	4,79	22,65	41,87	15,97
3	151 – 225	25	15,15	12,15	4,62	21,07	50,54	11,63
4	226 – 300	30	16,80	11,00	4,14	24,08	52,20	8,58
5	301 – 375	35	17,85	11,13	4,31	22,08	53,21	9,28
6	376 – 450	40	19,03	10,94	4,26	26,98	48,37	9,45
7	Semente madura (~ 280 mg)	60	16,50	10,18	3,41	41,15	37,87	7,39

Os resultados do conteúdo de óleo e ácidos graxos constituem a média de três repetições.

ED – Estádio de desenvolvimento.

DAF – Dias após o florescimento.

Quadro 2 – Estádios de desenvolvimento, idade cronológica, conteúdo e composição do óleo das sementes de soja da variedade CAC-1, crescidas à temperatura de 22/13 °C (dia/noite)

ED	<u>Semente</u> Peso fresco mg/semente	<u>DAF</u>	<u>Óleo bruto</u> % peso seco	<u>Composição do óleo</u> %				
				16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
1	0 – 75	20	7,77	14,44	4,68	15,11	38,51	27,26
2	76 – 150	26	10,75	11,94	4,14	20,06	45,23	18,62
3	151 – 225	34	13,53	11,07	3,52	18,75	50,68	15,99
4	226 – 300	38	15,72	11,38	4,16	22,27	48,98	13,20
5	301 – 375	43	15,68	10,29	3,13	18,03	54,03	14,53
6	376 – 450	50	16,03	10,48	3,86	19,21	53,50	12,96
7	Semente madura (~ 280 mg)	70	17,64	10,70	3,06	17,98	55,77	12,49

Os resultados do conteúdo de óleo e ácidos graxos constituem a média de três repetições.

ED – Estádio de desenvolvimento.

DAF – Dias após o florescimento.

Quadro 3 – Estádios de desenvolvimento, idade cronológica, conteúdo e composição do óleo das sementes de soja da linhagem CC4, crescidas à temperatura de 34/28 °C (dia/noite)

ED	<u>Semente</u> Peso fresco mg/semente	<u>DAF</u>	<u>Óleo bruto</u> % peso seco	<u>Composição do óleo</u> %				
				16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
1	0 – 75	20	4,56	16,12	5,54	17,37	42,14	18,83
2	76 – 150	23	10,44	14,95	4,82	20,37	47,23	12,64
3	151 – 225	26	16,00	11,67	4,25	22,17	55,34	6,56
4	226 – 300	32	16,80	12,19	4,67	30,38	44,74	8,03
5	301 – 375	37	19,81	10,96	4,11	23,71	56,40	4,82
6	376 – 450	43	18,85	11,33	4,48	29,95	47,48	6,76
7	Semente madura (~ 280 mg)	65	17,00	9,62	3,42	44,53	38,54	3,89

Os resultados do conteúdo de óleo e ácidos graxos constituem a média de três repetições.

ED – Estádio de desenvolvimento.

DAF – Dias após o florescimento.

Quadro 4 – Estádios de desenvolvimento, idade cronológica, conteúdo e composição do óleo das sementes de soja da linhagem CC4, crescidas à temperatura de 22/13 °C (dia/noite)

ED	<u>Semente</u> Peso fresco mg/semente	<u>DAF</u>	<u>Óleo bruto</u> % peso seco	<u>Composição do óleo</u> %				
				16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
1	0 – 75	23	10,10	14,31	4,62	16,03	43,98	21,06
2	76 – 150	28	11,86	12,71	3,92	19,32	45,09	18,96
3	151 – 225	37	13,35	11,41	3,73	20,50	53,68	10,68
4	226 – 300	40	15,28	10,36	3,71	21,45	55,14	9,34
5	301 – 375	45	17,58	9,93	3,97	22,75	54,93	8,42
6	376 – 450	52	16,95	10,31	3,23	19,08	58,22	9,17
7	Semente madura (~ 280 mg)	73	18,27	10,25	3,04	21,55	58,24	6,92

Os resultados do conteúdo de óleo e ácidos graxos constituem a média de três repetições.

ED – Estádio de desenvolvimento.

DAF – Dias após o florescimento.

À temperatura de 34/28 °C (dia/noite), a variedade comercial CAC-1 apresentou teor de óleo crescente até o 6^o estágio de desenvolvimento e a linhagem CC4, até o 5^o. O teor de óleo bruto chegou a aproximadamente 18,9%. Na maturidade fisiológica, verificou-se um declínio nesse teor, atingindo apenas 16,7%.

À temperatura de 22/13 °C (dia/noite), ambos os genótipos apresentaram teor de óleo sempre crescente até a maturidade fisiológica, em que se verificou um teor de aproximadamente 17,9%. Assim, plantas crescidas em condições de alta temperatura apresentaram concentração de óleo ligeiramente inferior àquelas produzidas em condições de baixa temperatura.

De acordo com GIBSON e MULLEN (1996), as concentrações de proteína e óleo estão relacionadas com a temperatura ambiente durante o enchimento do grão de soja: a concentração de proteína declina entre 21 e 27 °C e aumenta quando a temperatura também aumenta para 35 °C, enquanto a concentração de óleo se eleva entre 21 e 29 °C e, então, decresce quando a temperatura sobe para 35 °C. Essa relação pode explicar a contradição de experimentos anteriores, em que se relatou uma correlação positiva entre altas temperaturas e concentração de óleo (HOWELL e CARTTER, 1958; WOLF et al., 1982). Adicionalmente, tanto a temperatura máxima quanto a mínima, durante todo o desenvolvimento da semente, são importantes em determinar a concentração de proteína e óleo; a temperatura máxima tem efeito maior na concentração do óleo 20 a 40 dias antes da maturidade fisiológica (GIBSON e MULLEN, 1996).

Segundo BAO e OHLROGGE (1999), um fator limitante para síntese de triacilgliceróis é o suprimento de ácidos graxos, e, portanto, a alta temperatura pode também estar influenciando a síntese de ácidos graxos nos plastídios.

A composição do óleo de soja, particularmente os teores dos ácidos graxos polinsaturados, foi também marcadamente alterada quando plantas cresceram em alta e baixa temperaturas. Os conteúdos dos ácidos palmítico e esteárico permaneceram estáveis nas sementes produzidas nas duas temperaturas avaliadas, ao passo que os teores dos ácidos graxos oléico, linoléico e linolênico foram, significativamente, influenciados pelas temperaturas de crescimento e desenvolvimento das plantas.

Nos genótipos CAC-1 e CC4, cultivados em baixa temperatura, o teor do ácido oléico (ácido graxo monoinsaturado – 18:1) diminuiu, enquanto os teores dos ácidos linoléico e linolênico (ácidos graxos polinsaturados – 18:2 e 18:3) aumentaram.

O ácido oléico atingiu, em média, 43% nas sementes de ambos os genótipos, crescidas em alta temperatura, enquanto nas sementes crescidas em baixa temperatura o conteúdo médio chegou a apenas 20%. Os ácidos linoléico e linolênico apresentaram, sob alta temperatura, conteúdos médios de 38 e 6% e sob baixa temperatura, 57 e 10%, respectivamente. Portanto, ácidos graxos polinsaturados perfazem um total de 44%, em média, nos genótipos cultivados em alta temperatura, enquanto em baixa temperatura esse total chega a 67%, aproximadamente. Logo, a diferença significativa no teor relativo de 18:1 foi acompanhada por diferenças compensatórias nas concentrações de 18:2 e 18:3.

A composição do óleo de soja deve ser alcançada por meio de diferentes taxas de síntese dos vários ácidos graxos e, dessa forma, também ser rigorosamente controlada, uma vez que ocorre variação nos conteúdos relativos até o período da maturidade fisiológica. Portanto, a diferença na composição dos ácidos graxos no óleo de soja, produzidos em alta e baixa temperaturas, indica que considerável efeito ambiental pode existir nas atividades enzimáticas responsáveis pela composição final do óleo (CHERRY et al., 1985).

Os resultados obtidos durante este estudo reforçam o trabalho de RENNIE e TANNER (1989), os quais avaliaram o conteúdo de ácidos graxos no óleo de soja de cinco linhagens com baixo teor do ácido linolênico em temperaturas que variaram de 15/12 °C a 40/30 °C – dia/noite. Esses autores concluíram que níveis dos ácidos palmítico e esteárico foram relativamente estáveis nessa grande faixa de temperaturas estudadas. Níveis do ácido linolênico, nas cinco linhagens, diminuíram de 7,4 – 8,2% a 15/12 °C para menos de 2% a 40/30 °C. Quando a temperatura variou de 15/12 °C para 40/30 °C, o nível do ácido oléico aumentou de 33 para 59%, enquanto o nível do ácido linoléico diminuiu de 44 para 20%, entre as linhagens. Outros resultados concordantes também foram obtidos por HOWELL e COLLINS (1957), RUBEL et al. (1972), WOLF et al. (1982), HAWKINS et al. (1983), CHERRY et al. (1985), SANGWAN et al. (1986) e SCHENEPLY e FEHR (1993).

Os teores de ácido linolênico, determinados durante o período de enchimento do grão, no óleo das sementes da variedade CAC-1 e da linhagem CC4 em resposta à temperatura de crescimento, são mostrados na Figura 1.

Observou-se que a produção do ácido linolênico é maior no início do enchimento do grão, fato também observado por HAMMOND et al. (1972) e WANG e HILDEBRAND (1988), os quais relataram que a soja e outras sementes oleaginosas produzem grande quantidade de ácido linolênico durante os estádios iniciais do desenvolvimento, podendo a fração óleo apresentar conteúdo maior que 30% desse ácido.

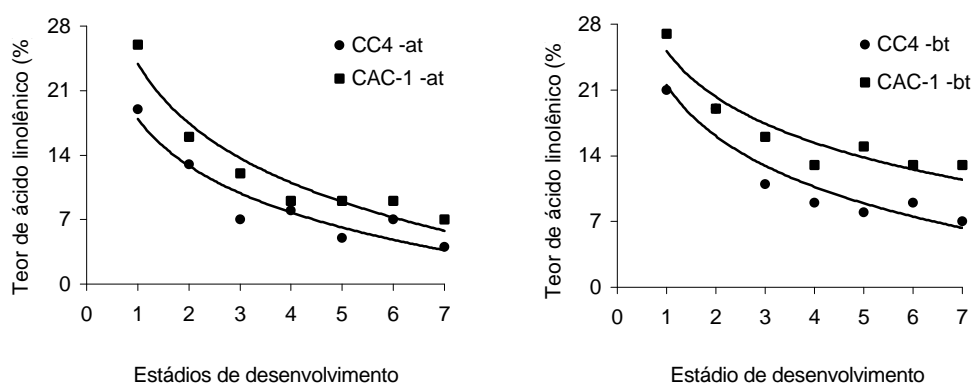


Figura 1 – Teor de ácido linolênico no óleo das sementes da variedade CAC-1 e da linhagem CC4, cultivadas em alta temperatura (at) – 34/28 °C (dia/noite) e em baixa temperatura (bt) – 22/13 °C (dia/noite). Estádios de desenvolvimento da semente de soja: 1^o – 0 a 75 mg, 2^o – 76 a 150 mg, 3^o – 151 a 225 mg, 4^o – 226 a 300 mg, 5^o – 301 a 375 mg, 6^o – 376 a 450 mg e 7^o – semente madura.

Outra observação é o fato de que a variedade comercial CAC-1 apresentou maior variação no conteúdo do ácido linolênico (7,4 – 12,5%) do que a linhagem CC4 (3,9 – 6,9%), quando cultivada em alta e baixa temperaturas, respectivamente. Em concordância com esse resultado está o do estudo de CARVER et al. (1986), os quais, comparando linhagens contendo alto teor de oléico e baixo teor de linolênico com linhagens que possuem teores normais dos dois ácidos graxos, em diversos locais, verificaram que o conteúdo de linolênico dos genótipos com composição de ácidos graxos modificada foi

menos sensível às variações ambientais do que genótipos com níveis normais. Contrariamente, KINNEY (1994) relatou que o efeito da temperatura é mais pronunciado em linhagens mutantes, produzidas por mutagênese química ou por engenharia genética, do que em linhagens normais.

Uma eficiente seleção de genótipos de soja, com melhor qualidade do óleo, requer melhor entendimento da natureza genética dessa característica e da influência dos fatores fisiológicos e ambientais sobre esta, além dos efeitos de interações. No Quadro 5 é apresentado um resumo da análise de variância, em que se observa o efeito dos diferentes fatores: temperatura, genótipo e estágio de desenvolvimento da semente e suas interações sobre a composição de ácidos graxos do óleo de soja.

Quadro 5 – Valores e significâncias dos quadrados médios (QM), médias e coeficientes de variação experimental obtidos das análises de variância do delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se variedade comercial (CAC-1) e uma isolinha dela derivada (CC4), com relação aos teores dos ácidos palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico

FV	GL	Quadrados Médios				
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
ED	6	11,07**	3,74**	278,08**	281,28**	354,87**
T	1	42,30**	9,50**	867,04**	407,05**	285,84**
ED*T	6	20,75**	0,10**	188,81**	147,80**	2,80**
G	1	2,9 ^{ns}	0,0082 ^{ns}	81,02**	101,64**	351,35**
ED*G	6	0,06**	0,088**	9,77**	7,62**	10,73**
T*G	1	0,29**	0,087*	3,88**	19,82**	2,98**
ED*T*G	6	0,21**	0,39**	9,80**	30,87**	4,78**
Resíduo	56	0,77	0,013	0,040	0,060	0,068
Média		11,89	4,11	22,51	48,98	12,50
CV (%)		1,20	2,72	0,88	0,49	2,08

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

^{ns} Não-significativo.

Os teores dos ácidos palmítico e esteárico não foram estatisticamente diferentes, no entanto uma diferença significativa nos teores dos ácidos oléico, linoléico e linolênico do óleo produzido à temperatura de 34/28 °C – dia/noite – e à temperatura de 22/13 °C – dia/noite – foi observada em ambos os genótipos estudados. Esses dados confirmam que os teores dos ácidos graxos insaturados constituem a característica contrastante entre os genótipos.

Os resultados do Quadro 5 indicam também haver interação entre os três fatores analisados: a temperatura tem efeito nos teores dos ácidos graxos constituintes da fração óleo, em ambos os genótipos, e que esses teores são diferentes nos vários estádios de desenvolvimento da semente de soja.

4. CONCLUSÕES

Os genótipos CAC-1 e CC4 apresentaram teor de óleo mais elevado em sementes produzidas em condições de baixa temperatura. Esse óleo conteve uma porcentagem maior de ácidos graxos polinsaturados: ácidos linoléico e linolênico. Em razão do aumento da quantidade de ácidos graxos polinsaturados, houve diminuição no teor do ácido oléico e ácido graxo monoinsaturado.

Com relação ao ácido linolênico, foi observado que seu teor foi maior nos primeiros estádios de desenvolvimento da semente de soja, nos dois genótipos estudados. Já na maturidade fisiológica, a linhagem CC4 apresentou maior estabilidade quanto à variação do teor do ácido linolênico no óleo produzido em condições de alta e baixa temperaturas.

Relata-se, portanto, que a linhagem CC4 com baixo teor de ácido linolênico, obtida por retrocruzamentos, apresenta perspectivas para ser liberada como variedade comercial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAO, X.; OHLROGGE, J. Supply of fatty acid is one limiting factor in the accumulation of triacylglycerol in developing embryos. **Plant Physiology**, v. 120, p. 1057-1062, 1999.
- BURTON, J. W. Soyabean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Field Crops Research**, v. 53, p. 171-186, 1997.
- CARVER, B. F.; BURTON, J. W.; CARTER JR.; WILSON, R.F. Response to environmental variation of soybean lines selected for altered unsaturated fatty composition. **Crop Science**, v. 26, p. 1176-1180, 1986.
- CHERRY, J. H.; BISHOP, L.; HASEGAWA, P. M.; LEFFLER, H. R. Differences in the fatty acid composition of soybean seed produced in northern and southern areas of the USA. **Biochemistry**, v. 24, p. 237-241, 1985.
- GESTEIRA, A. S. **Estudo de herança e de marcadores moleculares para teor de ácido linolênico em soja**. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 1997. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- GIBSON, L. R.; MULLEN, R. E. Soybean seed composition under high day and night growth temperatures. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 73, p. 733-737, 1996.
- GIBSON, L. R.; MULLEN, R. E. Influence of day and night temperature on soybean seed yield. **Crop Science**, v. 36, p. 98-104, 1996.
- HAMMOND, E. G.; FEHR, W. R.; SNYDR, H. E. Improving soybean quality by plant breeding. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 49, p. 33-35, 1972.

- HAMMOND, E. G.; FEHR, W. R. Improving the fatty acid composition of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 61, n. 11, p. 1713-1716, 1984.
- HAWKINS, S. E.; FEHR, W. R.; HAMMOND, E. G. Resource allocation in breeding for fatty acid composition of soybean oil. **Crop Science**, v. 23, p. 900-904, 1983.
- HEPPARD, E. P.; KINNEY, A. J.; STECCA, K. L.; MIAO, G. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal ω -6 desaturase genes in soybeans. **Plant Physiology**, v. 110, p. 311-319, 1996.
- HILDEBRAND, D.; COLLINS, G. Manipulation of linolenate and other fatty acids in soybean oil. **Soybean Research Documents Online** (<http://www.ag.uiuc.edu/~stratsoy/research>), 1998.
- HOWELL, R. W.; CARTTER, J. L. Physiological factors affecting composition of soybeans: II. Response of oil and other conditions. **Agronomy Journal**, v. 50, p. 664-667, 1958.
- HOWELL, R. W.; COLLINS, F. I. Factors affecting linolenic and linoleic acid content of soybean oil. **Agronomy Journal**, v. 49, p. 593-597, 1957.
- INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz; métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: 1985. v. 1, 533 p.
- JHAM, G. N.; TELES, F. F. F.; CAMPOS, L. G. Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 59, p. 132-133, 1982.
- KINNEY, A. J. Genetic modification the storage lipids of plants. **Currents Opinion in Biotechnology**, v. 5, p. 144-151, 1994.
- KINNEY, A. J. Development of genetically engineered soybean oils for food applications. **Journal of Food Lipids**, v. 3, p. 273-292m, 1996.
- MORAES. R. M. A. **Eficiência de seleção para teores dos ácidos oléico e linolênico em soja cultivada em duas temperaturas**. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 1999. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MOREIRA, M. A. Programa de melhoramento genético da qualidade de óleo e proteína da soja desenvolvido na UFV. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999. Londrina. **Anais...** Londrina, PR: Embrapa – Soja, p. 99-104.
- MOUNTS, T. L.; WARNER, K.; LIST, G. R.; NEFF, W. E.; WILSON, R. F. Low-linolenic acid soybean oils – alternatives to frying oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 71, p. 495-499, 1994.

- OHLROGGE, J. B.; JAWORSKI, J. G. Regulation of fatty acid biosynthesis. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 109-136, 1997.
- OSÓRIO, J.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, J.; MANCHA, M.; GARCÉS, R. Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acids in the oil. **Crop Science**, v. 35, p. 739-742, 1995.
- PORANKIEWIEZ, J.; SELSTAM, E.; CAMPBELL, D.; ÖQUIST, G. Membrane lipid composition and restoration of photosynthesis during low temperature acclimation in *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 405-412, 1998.
- RENNIE, B. D.; TANNER, J. W. Fatty acid composition of oil from soybean seeds grown at extreme temperatures. **Ibid**, v. 66, p. 1622-1624, 1989.
- RUBEL, A.; RINNE, R. W.; CANVIN, D. T. Protein, oil and fatty acid in developing soybean seeds. **Crop Science**, v. 12, p. 739-741, 1972.
- SANGWAN, N. K.; GUPTA, K.; DHINDSA, K. S. Fatty acid composition of developing soybeans. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 34, n. 3, p. 415-417, 1986.
- SCHNEBLY, S. R.; FEHR, W.R. Effect of years and planting dates on fatty acid composition of soybean genotypes. **Crop Science**, v. 33, p. 716-719, 1993.
- YADAV, N. S. Genetic modification of soybean oil quality. In: VERMA, D. P. S.; SHOEMAKER, R. C. (Eds.). **Soybean genetics, molecular biology and biotechnology**. [S. I.]: USA:CAB INTERNATIONAL, 1996. p. 127-188.
- WANG, X. M.; HILDEBRAND, D. F. Biosynthesis and regulation of linolenic acid higher plants. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 26, p. 77-792, 1988.
- WILCOX, J. R.; CAVINS, J. F. Normal and low linolenic acid soybean strains: response to planting date. **Crop Science**, v. 32, p. 1248-1251, 1992.
- WOLF, R. B.; CANVINS, J. F.; KLEIMAN, R.; BLACK, L. T. Effect of temperature on soybean seed constituents: oil, protein, moisture, fatty acids, amino acids and sugars. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 59, p. 230-232, 1982.

CAPÍTULO II

ENZIMAS ENVOLVIDAS NO ENRIQUECIMENTO CITOPLASMÁTICO DE ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS PARA A BIOSÍNTESE DO ÓLEO EM SEMENTES DE SOJA

1. INTRODUÇÃO

A fração lipídica nas sementes de culturas oleaginosas, como soja, canola, girassol e oliva, é a mais importante fonte de óleos comestíveis. A qualidade do óleo é dependente da sua composição em ácidos graxos e, particularmente, da proporção de ácidos graxos insaturados, nominalmente ácido oléico (C18:1), ácido linoléico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3). Esses ácidos graxos determinam o uso final do óleo; por exemplo, um óleo rico em ácido oléico é utilizado em frituras e saladas, enquanto aqueles com alto conteúdo em ácido linolênico são mais adequados para indústria de tintas, náilon etc. em substituição ao óleo de linho. Óleos ricos em ácidos graxos polinsaturados são inadequados para uso em produtos comestíveis por causa de problemas relacionados à estabilidade oxidativa e, conseqüentemente, formação de *off-flavour* (RAHMAN et al., 1994). Portanto, é a composição dos ácidos graxos no óleo que determina seu valor nutricional e suas características físico-químicas (BYRUM et al., 1997).

Os níveis dos ácidos linoléico e linolênico, os quais contribuem para a instabilidade oxidativa do óleo, dependem de dois fatores: da taxa de biossíntese e da disponibilidade para a síntese do óleo (YADAV, 1996).

A maioria da produção de ácidos graxos polinsaturados em sementes em desenvolvimento ocorre via dessaturação de 18:1 e 18:2, catalisada pelas dessaturases, localizadas no retículo endoplasmático (OHLROGGE et al., 1991; SOMERVILLE e BROWSE, 1991; ARONDEL et al., 1992). O substrato para as enzimas dessaturases é a fosfatidilcolina (PC) (SLACK et al., 1979; BROWSE e SLACK, 1981). Os ácidos graxos ligados à fosfatidilcolina, que, porventura, tornam-se insaturados, podem, subseqüentemente, ficar disponíveis para incorporação em triacilgliceróis de reserva, por meio de dois mecanismos: 1) reentrada no *pool* de acil-CoA pela lisofosfatidilcolina aciltransferase (LFCAT), que troca grupamentos acil ligados à posição 2 da fosfatidilcolina com aqueles livres no citossol na forma de acil-CoA (STYMNE et al., 1983; GRIFFITHS et al., 1988) ou 2) reentrada no *pool* de diacilgliceróis pela reação reversível da colinafosfotransferase (CPT) (SLACK et al., 1985; STYMNE STOBART, 1984). Notavelmente, CPT e LPCAT podem ter papéis importantes na determinação do conteúdo de ácidos graxos polinsaturados nos óleos vegetais (Figura 1).

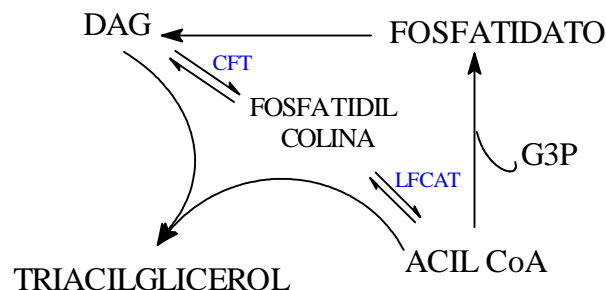


Figura 1 – Esquema do uso de acil-CoA na síntese de triacilgliceróis em sementes oleaginosas em desenvolvimento. DAG – diacilgliceróis, CPT – colinafosfotransferase, LPCAT – lisofosfatidilcolina aciltransferase e G3P – glicerol 3 fosfato.

Assim, a elucidação dos caminhos enzimáticos associados à síntese e degradação de lipídeos, a caracterização das enzimas envolvidas e a definição dos mecanismos que regulam a composição de lipídeos de reserva e estruturais são de grande interesse para a produção de sementes oleaginosas, geneticamente modificadas, que possuam óleos com atributos nutricionais e funcionais desejáveis (SOMERVILLE e BROWSE, 1991; KINNEY, 1996).

1.1. Colinafosfotransferase (CPT)

Fosfatidilcolina (PC) é o principal constituinte fosfolipídico da maioria das membranas celulares eucarióticas, e a enzima que catalisa o passo final de sua síntese é a colinafosfotransferase (CORNELL e MacLENNAM, 1985). Essa enzima consiste de 389 resíduos de aminoácidos, sendo uma proteína integral de membrana do retículo endoplasmático liso, com sete domínios hidrofóbicos (DEWEY et al., 1994).

Colinafosfotransferase (CDP – colina: 1, 2 – diacilglicerol colinafosfotransferase : EC 2.7.8.2) catalisa a troca reversível entre o *pool* de fosfatidilcolina e diacilgliceróis. Por causa da reversibilidade da reação, fosfatidilcolina pode agir como um precursor de espécies moleculares de diacilgliceróis, altamente insaturadas, nas sementes que acumulam ácidos graxos polinsaturados na fração óleo de reserva. É uma enzima-chave no metabolismo de sementes oleaginosas; conseqüentemente, sua atividade e mecanismos de regulação são essenciais para o entendimento da distribuição de ácidos graxos para a biossíntese de lipídeos (VOGEL e BROWSE, 1995).

Em plantas que acumulam em seus lipídeos de reserva ácidos graxos incomuns, a colinafosfotransferase pode representar um papel relevante no sentido de excluir espécies moleculares de fosfatidilcolina contendo ácidos graxos incompatíveis com a estrutura da membrana, transformando-as em diacilgliceróis, que, por vez, podem sofrer a ação da diacilglicerol aciltransferase, cuja função é a produção de triacilgliceróis (VOGEL e BROWSE, 1996).

1.2. Lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT)

O segundo caminho para enriquecer o *pool* de acil-CoA com ácidos graxos polinsaturados envolve a reação catalisada pela acil-CoA: lisofosfatidilcolina aciltransferase (VOGEL e BROWSE, 1996). Como a colinafosfotransferase, a lisofosfatidilcolina aciltransferase é uma proteína integral da membrana do retículo endoplasmático (MOREAU e STUMPF, 1982), prontamente solúvel na forma ativa, não estando associada covalentemente a nenhum complexo protéico na membrana (GENNITY e STUMPF, 1985).

Acil-CoA: lisofosfatidilcolina aciltransferase (EC 2.3.1.23) catalisa a reação reversível entre grupamentos acil do *pool* de acil-CoA citoplasmático e grupamentos acil insaturados ligados à posição 2 da fosfatidilcolina. O equilíbrio da reação é em direção da síntese de fosfatidilcolina, ou seja, acilação da lisofosfatidilcolina, uma vez que ela resulta na clivagem de uma ligação tioéster, rica em energia (STYMNE e STOBART, 1984). Segundo GRIFFITHS et al. (1988), a permuta entre os grupamentos acil é governada por: a) velocidade e especificidade da troca de grupamentos acil entre acil-CoA e fosfatidilcolina, b) taxa de insaturação de ácidos graxos em fosfatidilcolina e c) atividade e especificidade da lisofosfatidilcolina aciltransferase.

De acordo com STYMNE et al. (1983), a lisofosfatidilcolina aciltransferase tem como substrato principal o oleato, preferencialmente ao linoleato e este ao linolenato, enquanto estearil-CoA foi completamente excluído quando presente em uma mistura de acil-CoA contendo ácidos graxos insaturados. STOBART e STYMNE (1985) demonstraram que, na troca, oleoil-CoA entra na posição 2 da fosfatidilcolina e sai linoleato, e este é, preferencialmente, usado na acilação da posição 2 do glicerol-3-fosfato (GRIFFITHS et al., 1985). Portanto, essa enzima é de fundamental importância para regular o tipo de grupamentos acil constituintes dos triacilgliceróis que acumulam nas sementes em desenvolvimento. De acordo com STOBART et al. (1983), a permuta de grupamentos acil entre grupamentos acil-CoA e fosfatidilcolina representa o mecanismo predominante na regulação da qualidade de ácidos graxos polinsaturados no *pool* de acil-CoA para a síntese do óleo, em sementes em desenvolvimento de açafrão.

A composição de ácidos graxos saturados e insaturados dos lipídeos de membrana e reserva é influenciada pelo genótipo e condições ambientais (CHERRY et al., 1985). Existe correlação inversa entre conteúdo de ácidos graxos polinsaturados e temperatura de crescimento da planta, e ácidos graxos polinsaturados aumentam com o decréscimo da temperatura (WOLF et al., 1982; HEPPARD et al., 1996).

Aumento no conteúdo de ácidos graxos polinsaturados nos lipídeos estruturais proporciona maior fluidez na membrana, por diminuir o empacotamento, altamente ordenado, dos grupamentos acil no interior da membrana. Decréscimo na fluidez devido a baixas temperaturas provoca perda da permeabilidade da membrana e decréscimo de atividades enzimáticas associadas a ela. Portanto, ácidos graxos polinsaturados são requeridos para o crescimento e tolerância de plantas superiores à baixa temperatura; elas induzem não apenas aumento no conteúdo do ácido linolênico, mas também no conteúdo de proteínas denominadas desidrinas (NISHIDA e MURATA, 1996; HAMADA et al., 1998).

O objetivo deste capítulo foi buscar maior entendimento dos mecanismos de incorporação de ácidos graxos polinsaturados na fração óleo. Para isso, foram feitas a caracterização cinético-enzimática das enzimas colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase e a determinação de suas atividades em sementes da variedade CAC-1 e da linhagem CC4, produzidas sob duas condições de temperatura: 34/28 °C e 22/13 °C (dia/noite).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fonte de enzimas

Sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) do cultivar comercial CAC-1 e da linhagem CC4 derivada desse cultivar foram utilizadas neste experimento. CAC-1 possui teor normal do ácido linolênico (8%) e CC4, baixo teor (cerca de 3%).

A linhagem CC4 é resultante do cruzamento entre a variedade comercial CAC-1 e o acesso BARC-12. Este acesso, com menos de 3% do ácido linolênico, foi desenvolvido pelo USDA-ARS em Beltsville, Maryland (EUA). Ele foi cruzado com o cultivar comercial CAC-1, obtendo-se a geração F1. As plantas F1 foram autofecundadas, produzindo a geração F2. Sementes F2 selecionadas para baixo teor de ácido linolênico foram plantadas em casa de vegetação e retrocruzadas com CAC-1. Esse procedimento de retrocruzamento, seguido de autofecundações e seleção de sementes, foi realizado até o terceiro ciclo de retrocruzamento, produzindo, dessa forma, linhagens quase isogênicas (RC3F4) de CAC-1, que apresentam baixo teor de ácido linolênico. Essas linhagens fazem parte do germoplasma do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa, visando à criação de germoplasma para sua maior aceitabilidade na alimentação humana, bem como a uma maior estabilidade oxidativa do óleo.

As plantas foram cultivadas no período de maio a setembro de 2000. Até o início do período reprodutivo, elas foram crescidas a uma temperatura média diária de 31 °C e, então, transferidas para duas casas de vegetação: uma com sistema de ventilação, em que a temperatura máxima média era de 22 °C e a mínima média, de 13 °C. Na outra, com sistema de aquecimento artificial, as temperaturas máxima e mínima médias foram de 34 e 28 °C, respectivamente. As medidas de temperatura, por meio de um higrômetro, foram feitas diariamente, às 17 h.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por planta e ambiente de temperatura, totalizando 45 vasos com capacidade para 4,0 kg de solo.

As sementes foram coletadas em um período de aproximadamente três meses, separadas em seis estádios de desenvolvimento, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C, para posteriores análises. Para o estudo cinético, foram utilizadas sementes de diversos estádios de desenvolvimento.

As atividades da colinafosfotransferase e da lisofosfatidilcolina aciltransferase foram determinadas nos seis estádios de desenvolvimento, os quais foram definidos com base no peso fresco da semente: 1^o – 0 a 75 mg, 2^o – 76 a 150 mg, 3^o – 151 a 225 mg, 4^o – 226 a 300 mg, 5^o – 301 a 375 mg e 6^o – 376 a 450 mg. Esses estádios compreenderam, praticamente, todo o período de enchimento do grão, com o último estágio precedendo a maturidade fisiológica da semente. No mínimo, 100 sementes por estágio foram coletadas.

2.2. Obtenção do extrato bruto

Aproximadamente quatro gramas de sementes de soja de cada estágio de desenvolvimento, anteriormente definidos, foram macerados por dois minutos, em 5 mL de tampão TRIS/HCl 20 mmolL⁻¹, pH 7,5, contendo EDTA 1 mmolL⁻¹, EGTA 1 mmolL⁻¹, DTT 5 mmolL⁻¹ e sorbitol 0,33 molL⁻¹. O homogenato foi filtrado, através de camadas de gaze. Tal procedimento foi repetido por mais duas vezes com o resíduo; o *pool* de filtrados foi centrifugado a 18.000 g por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado a 105.000 g por uma hora, a 4 °C. Ao precipitado – *pellet* microssomal – foram

adicionados 8 mL de tampão HEPES/KOH 10 mmolL⁻¹, pH 7,5, contendo EDTA 2 mmolL⁻¹, EGTA 0,5 mmolL⁻¹ e DTT 1 mmolL⁻¹, o qual foi novamente centrifugado a 105.000 g por uma hora, a 4 °C. Os microssomas lavados foram ressuspensos em 4 mL de tampão HEPES-KOH 10 mmolL⁻¹, pH 7,5, contendo EDTA 2 mmolL⁻¹ e EGTA 0,5 mmolL⁻¹; em todas as etapas, as amostras foram mantidas em banho de gelo. Em seguida, esse extrato foi dividido em alíquotas de 0,5 mL e, imediatamente, congelado a – 80 °C (SLACK et al., 1979 e 1985; VOGEL e BROWSE, 1995).

2.3. Determinação de proteínas totais no extrato microssomal

As determinações de proteínas foram realizadas pelo método do ácido bicinonínico (SMITH et al., 1985), tendo sido utilizado albumina sérica bovina (BSA) como padrão, na concentração de 0,24%. Para determinações em triplicata, a 25 µL da amostra foi adicionado 1 mL do reagente de trabalho (2:1 solução de ácido bicinonínico:solução de sulfato de cobre). A mistura foi agitada e colocada em banho-maria a 37 °C, por um período de 30 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e a absorbância, lida a 562 nm.

2.4. Métodos analíticos cinéticos

2.4.1. Compostos radioativos e determinação da radioatividade nas amostras contendo ¹⁴C

Citidina 5'- difosfo[metil-¹⁴C]colina e [1-¹⁴C]oleoil-CoA foram adquiridas da Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, com atividade específica de 110 Ci.mg⁻¹ (98% de pureza radioquímica) e 54,2 Ci.mg⁻¹ (99% de pureza radioquímica), respectivamente. As soluções-estoque foram preparadas em água deionizada e armazenadas a – 20 °C.

A radioatividade, nas soluções-teste, foi determinada no espectrômetro de cintilação líquida da BECKMAN (modelo LS 6500). A medida da radioatividade foi feita por 15 minutos, duas vezes para cada amostra, ou até a obtenção de erro sigma inferior a 1%.

O coquetel de cintilação utilizado neste experimento foi adquirido da SIGMA, sendo próprio para amostras não-aquosas.

Em todos os experimentos, a radioatividade detectada em cpm (contagens por minuto) foi transformada em nmoles de CDP[¹⁴C]colina, para a colinafosfotransferase, e nmoles de [¹⁴C]oleoil-CoA, para lisofosfatidilcolina aciltransferase, incorporados em diacilgliceróis por minuto por mg de proteína microssomal. Os cálculos para conversão foram:

COLINAFOSFOTRANSFERASE

- a) Transformação de cpm para dpm (desintegração por minuto) e eficiência de 97% para ¹⁴C:
 - 46.500 dpm equivale a 45.250 cpm.
- b) Transformação de dpm para porcentagem de radioatividade incorporada à fase orgânica:
 - 10 µL da solução de CDP-[¹⁴C]colina (0,0645 nmoles) correspondem a 100% de radioatividade (dpm total); dpm relativo à radioatividade incorporada à fase orgânica equivale a x% de radioatividade.
- c) Transformação de porcentagem de radioatividade para nmoles de CDP[¹⁴C]colina incorporados a diacilgliceróis por minuto por mg de proteína microssomal:
 - x% de radioatividade na fase orgânica, encontrada no item b, corresponde a y nmoles de CDP-colina incorporada a diacilglicerol, em que 6,06455 nmoles de CDP-colina (CDP-colina + CDP[¹⁴C]colina) contidos na mistura reacional correspondem a 100%.
 - Divide-se o valor encontrado por cinco minutos para obter a quantidade de nmoles de CDP[¹⁴C]colina incorporados em diacilgliceróis por minuto, além da divisão pela quantidade de proteína no extrato microssomal, para obter a atividade específica.

LISOFOSFATIDILCOLINA ACILTRANSFERASE

- a) Transformação de cpm para dpm (desintegração por minuto) e eficiência de 97% para ¹⁴C:
 - 46.500 dpm equivalem a 45.250 cpm.

- b) Transformação de dpm para porcentagem de radioatividade incorporada à fase orgânica:
- 200 µL da solução de [¹⁴C]oleoil-CoA (3,31 nmoles) correspondem a 100% de radioatividade (dpm total); dpm relativo à radioatividade incorporada à fase orgânica equivale a x% de radioatividade.
- c) Transformação de porcentagem de radioatividade para nmoles de [¹⁴C]oleoil-CoA incorporados a palmitoil-lisofosfatidilcolina por minuto por mg de proteína microsomal:
- x% de radioatividade na fase orgânica, encontrada no item b, corresponde a y nmoles de oleoil-CoA incorporada a palmitoil-lisofosfatidilcolina, em que o número total de nmoles de oleoil-CoA (oleoil-CoA + [¹⁴C]oleoil-CoA) – 163,31 – contidos na mistura reacional corresponde a 100%.
 - Divide-se o valor encontrado por cinco minutos para obter a quantidade de nmoles de [¹⁴C]oleoil-CoA incorporados a palmitoil-lisofosfatidilcolina por minuto, além da divisão pela quantidade de proteína no extrato microsomal, para obter a atividade específica.

2.4.2. Medida da atividade da colinafosfotransferase, através da incorporação de [¹⁴C]colina em fosfatidilcolina, a partir de CDP-[¹⁴C]colina

A atividade da colinafosfotransferase sobre CDP-colina (traçador CDP-[¹⁴C]colina) foi realizada segundo o método de SLACK et al. (1985). O método baseia-se na medida da radioatividade presente na fase orgânica, a qual contém fosfatidil[¹⁴C]colina resultante da reação entre diacilgliceróis e CDP-[¹⁴C]colina.

Para análise da atividade da colinafosfotransferase, foram adicionadas ao extrato microsomal alíquotas correspondentes a 0,1 mg de proteína, tampão Tricina-KOH 60 mmolL⁻¹, pH 8,0, contendo MgCl₂ 15 mmolL⁻¹, EDTA 1 mmolL⁻¹, EGTA 0,5 mmolL⁻¹ e DTT 5 mmolL⁻¹, 10 µL de CDP-colina 4 x 10⁻⁵ molL⁻¹ e 10 µL de CDP-[¹⁴C]colina 4 x 10⁻⁷ molL⁻¹ (3,9 x 10⁻³ Ci), totalizando um volume final de 0,15 mL. A mistura reacional foi incubada a 29 °C, e, após

cinco minutos de incubação, as reações foram finalizadas pela adição de 0,35 mL de HCl 0,1 mol.L⁻¹. A extração dos lipídeos foi feita pela adição de 1,0 mL de clorofórmio/metanol 1:1 (v/v). A radioatividade total na fase orgânica foi medida no espectrômetro de cintilação líquida.

Essa mistura reacional foi utilizada para todos os testes de atividade da colinafosfotransferase, exceto quando mencionadas as alterações.

2.4.2.1. Curva de tempo para formação de fosfatidil[¹⁴C]colina

A atividade da colinafosfotransferase foi analisada nos tempos de 2,5; 5; 10; 15; 20; e 25 minutos, utilizando-se 80,5 µL de extrato microsomal de sementes de soja, 10 µL de CDP-colina 4 x 10⁻⁵ molL⁻¹ e 10 µL de CDP-[¹⁴C]colina 4 x 10⁻⁷ molL⁻¹ (3,9 x 10⁻³ Ci).

Nos tempos de reação analisados, a formação do produto foi linear por um período de 10 minutos de incubação.

2.4.2.2. Efeito da temperatura na formação de fosfatidil[¹⁴C]colina

O efeito da temperatura sobre a taxa de formação de fosfatidil[¹⁴C]colina, catalisada pela colinafosfotransferase, foi determinado a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Utilizou-se banho-maria para que as soluções alcançassem as respectivas temperaturas.

2.4.2.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

A determinação dos parâmetros cinéticos da colinafosfotransferase foi realizada, utilizando-se CDP-colina como substrato, nas concentrações de 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; e 128 x 10⁻² mmolL⁻¹, além de CDP-[¹⁴C]colina (traçador) na concentração de 4 x 10⁻⁷ mmolL⁻¹ (3,9 x 10⁻³ Ci).

Os parâmetros cinéticos, no estado estacionário, foram obtidos por meio da regressão não-linear, utilizando-se o programa de computação Enzfitter (LEATHERBARROW, 1987).

2.4.3. Medida da atividade da lisofosfatidilcolina aciltransferase, através da incorporação de [¹⁴C]oleoil em lisofosfatidilcolina, a partir de [¹⁴C]oleoil-CoA e palmitoil-lisofosfatidilcolina

A atividade da lisofosfatidilcolina aciltransferase sobre oleoil-CoA (traçador -[¹⁴C]oleoil-CoA) foi realizada segundo o método de STYMNE e STOBART (1984). O método baseia-se na medida da radioatividade presente na fase orgânica, a qual é resultante da formação de fosfatidilcolina-[¹⁴C]oleoil a partir de palmitoil-lisofosfatidilcolina e [¹⁴C]oleoil-CoA.

Para análise da atividade da lisofosfatidilcolina aciltransferase, foi adicionado a uma alíquota do extrato microsomal (equivalente a 0,21 mg de proteína) tampão fosfato de potássio 0,1 molL⁻¹, pH 7,2, contendo palmitoil-lisofosfatidilcolina 1 x 10⁻⁴ molL⁻¹, 50 µL de oleoil-CoA 1,6 x 10⁻⁴ molL⁻¹ e 200 µL de [¹⁴C]oleoil-CoA 3,4 x 10⁻⁶ molL⁻¹ ((1,9 x 10⁻² Ci), totalizando um volume final de 1 mL. A mistura reacional foi incubada a 30 °C, e, após cinco minutos de incubação, as reações foram finalizadas pela adição de 3 mL de ácido acético 0,15 molL⁻¹. A extração dos lipídeos foi pela adição de 4 mL de uma solução de clorofórmio/metanol/ácido acético 10:20:7,5 (v/v/v). Após a separação da fase orgânica, foram adicionados 10 mL de clorofórmio e 10 mL de água. Novamente, a fase orgânica foi separada, evaporada por borbulhamento com N₂ e redissolvida em 0,5 mL de clorofórmio. A radioatividade total na fase orgânica foi medida no espectrômetro de cintilação líquida.

Essa mistura reacional foi utilizada para todos os testes de atividade da lisofosfatidilcolina aciltransferase, exceto quando mencionadas as alterações.

2.4.3.1. Curva de tempo para formação de fosfatidilcolina-[¹⁴C]oleoil

A atividade da lisofosfatidilcolina aciltransferase foi analisada nos tempos de 2,5; 5; 10; 15; 20; e 25 minutos, utilizando-se 77,4 µL de extrato microsomal de sementes de soja (variedade CAC-1), 50 µL de oleoil-CoA 1,6 x 10⁻⁴ molL⁻¹ e 200 µL de [¹⁴C]oleoil-CoA 3,4 x 10⁻⁶ molL⁻¹ (1,9 x 10⁻² Ci).

Nos tempos de reação analisados, a formação do produto foi linear por um período de 25 minutos de incubação.

2.4.3.2. Efeito da temperatura na formação de fosfatidilcolina-[¹⁴C]Oleoil

O efeito da temperatura sobre a taxa de formação de fosfatidilcolina-[¹⁴C]oleoil, catalisada pela lisofosfatidilcolina aciltransferase, foi determinado a 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C. Foi utilizado banho-maria para que as soluções alcançassem as respectivas temperaturas.

2.4.3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

A determinação dos parâmetros cinéticos da lisofosfatidilcolina aciltransferase foi realizada, utilizando-se oleoil-CoA como substrato, nas concentrações de 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,49; 0,64; e 1,6 mmolL⁻¹, além de [¹⁴C]oleoil-CoA (traçador) na concentração de 3,4 x 10⁻⁶ mmolL⁻¹ (1,9 x 10⁻² Ci).

Os parâmetros cinéticos, no estado estacionário, foram obtidos por meio da regressão não-linear, utilizando-se o programa de computação Enzfitter (LEATHERBARROW, 1987).

2.5. Determinação da atividade da colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase em sementes de soja, submetidas a diferentes temperaturas

COLINAFOSFOTRANSFERASE

Para análise da atividade da colinafosfotransferase sobre CDP-colina (traçador CDP-[¹⁴C]colina), foi adicionado ao extrato microsomal (alíquotas correspondentes a 0,1 mg de proteína) tampão Tricina-KOH 60 mmolL⁻¹, pH 8,0, contendo MgCl₂ 15 mmolL⁻¹, EDTA 1 mmolL⁻¹, EGTA 0,5 mmolL⁻¹ e DTT 5 mmolL⁻¹, 10 µL de CDP-colina 4 x 10⁻⁵ molL⁻¹ e 10 µL de CDP-[¹⁴C]colina 4 x 10⁻⁷ molL⁻¹ (3,9 x 10⁻³ Ci), totalizando um volume final de 0,15 mL. A mistura reacional foi incubada a 30 °C e, após 5 minutos de incubação, as reações foram finalizadas pela adição de 0,35 mL de HCl 0,1 mol.L⁻¹. A

extração dos lipídeos foi pela adição de 1,0 mL de solução de clorofórmio/metanol 1:1 (v/v). A radioatividade total na fase orgânica foi medida no espectrômetro de cintilação líquida.

LISOFOSFATIDILCOLINA ACILTRANSFERASE

Para análise da atividade da lisofosfatidilcolina aciltransferase, foi adicionado a uma alíquota do extrato microssomal (equivalente a 0,12 mg de proteína) tampão fosfato de potássio $0,1 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,2, contendo palmitoil-lisofosfatidilcolina $1 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$, 50 μL de oleoil-CoA $1,6 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ e 200 μL de [^{14}C]oleoil-CoA $3,4 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ ($1,9 \times 10^{-2} \text{ Ci}$), totalizando um volume final de 1 mL. A mistura reacional foi incubada a 30 °C e, após cinco minutos de incubação, as reações foram finalizadas pela adição de 3 mL de ácido acético $0,15 \text{ molL}^{-1}$. A extração dos lipídeos foi feita pela adição de 4 mL de uma solução de clorofórmio/metanol/ácido acético 10:20:7,5 (v/v/v). Após separação da fase orgânica, foram adicionados 10 mL de clorofórmio e 10 mL de água. Novamente, a fase orgânica foi separada, evaporada por borbulhamento com N_2 e redissolvida em 0,5 mL de clorofórmio. A radioatividade total na fase orgânica foi medida no espectrômetro de cintilação líquida.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Colinafosfotransferase

3.1.1. Curva de tempo para formação de fosfatidil[¹⁴C]colina

Com o objetivo de determinar a linearidade da reação catalisada pela colinafosfotransferase, foi realizada a curva de tempo. Na Figura 2, apresenta-se a curva de tempo para formação de fosfatidil[¹⁴C]colina, catalisada pela colinafosfotransferase, a qual se apresentou linear por um período de 10 minutos. Após esse tempo, ocorreu decréscimo na taxa de atividade.

Como não houve adição de diacilgliceróis, um dos substratos da colinafosfotransferase é provável que sua concentração endógena estava em quantidade suficiente para manter, inicialmente, uma taxa linear de atividade; porém, à medida que foram consumidos na reação, os diacilgliceróis tornaram-se um fator limitante da velocidade de reação.

Foi definido o tempo de cinco minutos de reação para realização dos experimentos posteriores.

3.1.2. Efeito da temperatura na formação de fosfatidil[¹⁴C]colina

O efeito da temperatura sobre a atividade da colinafosfotransferase está apresentado na Figura 3. A temperatura ótima de atividade para essa enzima foi de 30 °C. Valor similar de temperatura ótima foi relatado por vários autores (HARWOOD, 1976; SLACK et al., 1985; VOGEL e BROWSE, 1995 e 1996).

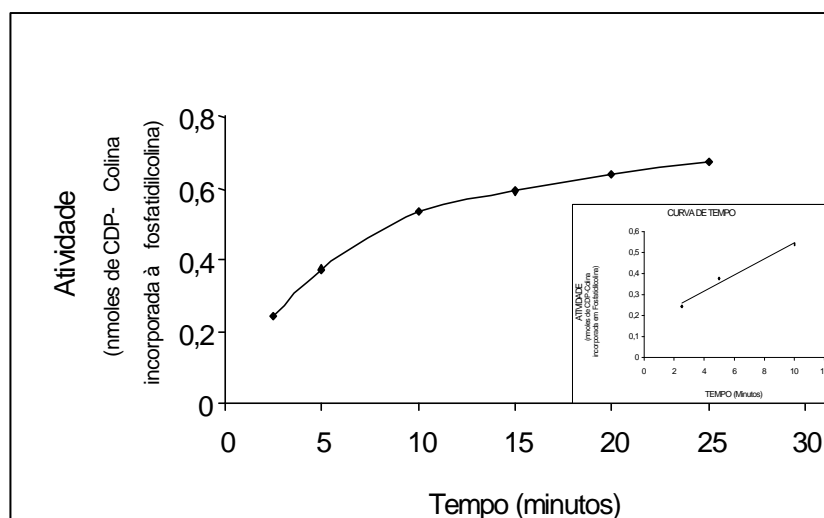


Figura 2 – Curva de tempo para formação de fosfatidil¹⁴C]colina, catalisada pela colinafosfotransferase de sementes de soja. Condições experimentais: tampão Tricina-KOH $6 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$, pH 8,0; CDP-colina $4 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$; e CDP-¹⁴C]colina $4 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$. Quantidade de extrato microsomal: 80,5 μL . Concentração de proteína total no extrato microsomal: 1,28 mg/mL. O experimento foi conduzido a 30 °C.

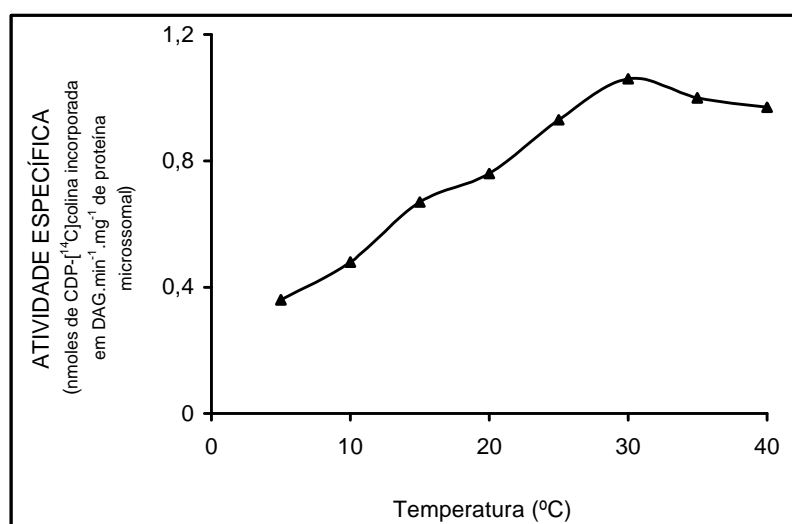


Figura 3 – Efeito da temperatura sobre a formação de fosfatidil¹⁴C]colina, catalisada pela colinafosfotransferase de sementes de soja. Condições experimentais: tampão Tricina-KOH $6 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$, pH 8,0; CDP-colina $4 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$; e CDP-¹⁴C]colina $4 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$. Quantidade de extrato microsomal: 85,1 μL . Concentração de proteína total no extrato microsomal: 1,21 mg/mL. A mistura reacional foi incubada por cinco minutos.

A presença de mais de um pico de atividade, um ombro a 15 °C, indica que essa enzima ocorre na forma de isoenzimas. Confirmando essa hipótese, DEWEY et al. (1994) relataram que o gene que codifica para colinafosfotransferase representa um membro de uma pequena família multigênica. A existência de isoenzimas evidencia que algumas podem ser ativas em temperaturas mais baixas.

Assim, as isoenzimas colinafosfotransferases de semente de soja podem ser uma das enzimas da biossíntese de lipídeos que contribuem para maior produção de ácidos graxos polinsaturados para serem utilizados na biossíntese dos lipídeos estruturais e dos lipídeos de reserva. Dessa forma, plantas de soja, sob baixa temperatura, podem estar produzindo essas isoenzimas como um dos mecanismos de tolerância ao frio.

3.1.3. Determinação dos parâmetros cinético-enzimáticos, K_{mapp} e V_{maxapp} , para colinafosfotransferase

Na Figura 4, apresenta-se o gráfico de Michaelis-Menten para formação de fosfatidil[¹⁴C]colina, catalisada pela colinafosfotransferase. Observou-se que essa enzima segue a cinética de Michaelis-Menten, produzindo curva hiperbólica de velocidade *versus* concentração de substrato.

Os valores dos parâmetros cinéticos K_{Mapp} e V_{maxapp} , calculados para formação dos produtos, estão apresentados no Quadro 1.

De acordo com MOORE (1982), a colinafosfotransferase do endosperma de mamona e folhas de espinafre possui um K_{mapp} para CDP-colina de aproximadamente $0,1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, enquanto a colinafosfotransferase de cotilédones em desenvolvimento e de açafrao possui um K_{mapp} de $0,4 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ (SLACK et al., 1985). Uma vez que o valor numérico de K_M estabelece o nível intracelular aproximado de substrato, ou seja, reflete o ambiente celular e é uma constante para dada enzima, esse valor fornece um meio de comparação entre enzimas de diferentes organismos ou de diferentes tecidos do mesmo organismo, ou do mesmo tecido em diferentes estádios de desenvolvimento. Portanto, infere-se, com base na comparação de dados, que as enzimas oriundas de mamona, espinafre e açafrao possuem uma afinidade aparente ligeiramente maior pelo substrato em relação à colinafosfotransferase da semente de soja.

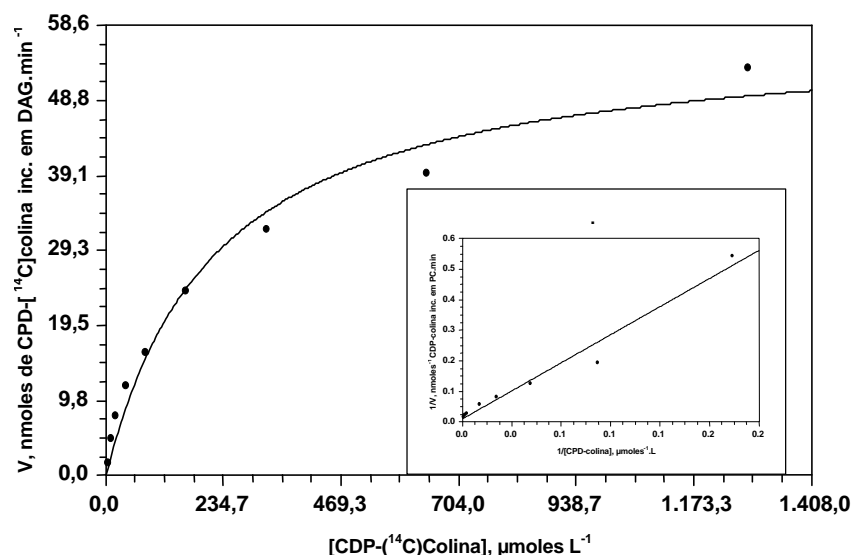


Figura 4 – Gráfico de Michaelis-Menten para formação de fosfatidil[¹⁴C]colina, catalisada pela colinafosfotransferase de sementes de soja. Condições experimentais: tampão Tricina-KOH $6 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$, pH 8,0; CDP-colina 0,25 a $128 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$; e CDP-[¹⁴C]colina $4 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$. Quantidade de extrato microsomal: 66,3 μL . Concentração de proteína total no extrato microsomal: 1,60 mg/mL. O experimento foi conduzido a 30 °C, durante cinco minutos. A linha contínua foi traçada com base em pontos teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten, para obtenção de $K_{m,app}$ e $V_{max,app}$. Os pontos são experimentais. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk.

Quadro 1 – Parâmetros cinéticos $K_{m,app}$ e $V_{max,app}$, para formação de fosfatidil[¹⁴C]colina catalisada pela colinafosfotransferase de sementes de soja, obtida por meio de regressão não-linear, utilizando-se o programa de computação Enzfitter (LEATHERBARROW, 1987)

COLINAFOSFOTRANSFERASE	
$K_{m,app}$	$2,3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$
$V_{max,app}$	89,30 nmoles de CDP-[¹⁴ C]colina incorporada a DAGs. min^{-1}

3.2. Lisofosfatidilcolina aciltransferase

3.2.1. Curva de tempo para formação de fosfatidilcolina-[¹⁴C]oleoil

Na Figura 5, mostra-se que a curva de tempo para formação de fosfatidilcolina-[¹⁴C]oleoil, catalisada pela lisofosfatidilcolina aciltransferase, apresentou-se linear por todo o período analisado, ou seja, 25 minutos. A linearidade da curva por períodos mais prolongados foi encontrada por GRIFFITHS et al. (1985), os quais observaram uma taxa linear de incorporação de ¹⁴C, na fração lipídica total, nos primeiros 80 minutos, em açafrão e girassol; e por STYMNE e STOBART (1985), que verificaram, em cotilédones de linho em desenvolvimento, uma atividade linear de 40 minutos.

Foi definido o tempo de cinco minutos de reação para realização dos experimentos posteriores.

3.2.2. Efeito da temperatura na formação de fosfatidilcolina-[¹⁴C]oleoil

O efeito da temperatura sobre a atividade da lisofosfatidilcolina aciltransferase está apresentada na Figura 6.

Observa-se que ocorreram, pelo menos, dois picos de atividade, um entre 10 e 15 °C e o outro a 25 °C. A temperatura de análise, em experimentos posteriores, foi de 30 °C, uma vez que a diferença entre 25 e 30 °C é pequena, também para efeito de comparação de parâmetros com a colinafosfotransferase.

A presença de mais de um pico de atividade indica a existência de isoformas da enzima, o que indica que estas, apresentando alta atividade em baixas temperaturas, poderiam contribuir para o aumento do teor de ácidos graxos polinsaturados na fração óleo, quando plantas de soja cresceram em condições de baixa temperatura.

Pelo fato de essa enzima fazer parte do conjunto de enzimas responsáveis pelo enriquecimento do *pool* citoplasmático de acil-CoA polinsaturados para serem utilizados na biossíntese do óleo, possivelmente a ocorrência dessas isoformas auxiliariam na produção de quantidades maiores desses ácidos, os quais forneceriam uma consistência líquida à fração óleo de reserva nas sementes produzidas em baixas temperaturas.

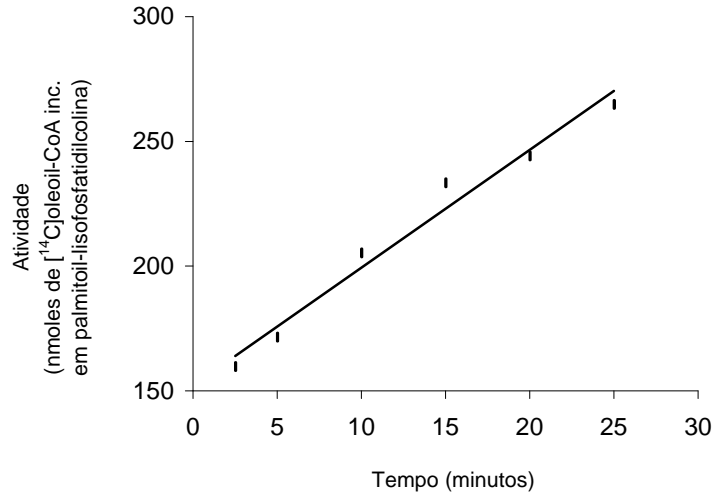


Figura 5 – Curva de tempo para formação de fosfatidilcolina-[¹⁴C]oleoil, catalisada pela lisofosfatidilcolina aciltransferase de sementes de soja. Condições experimentais: tampão fosfato de potássio $1 \times 10^{-1} \text{ molL}^{-1}$, pH 7,2; oleoil-CoA $1,6 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$; e [¹⁴C]oleoil-CoA $3,4 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$. Quantidade de extrato microsomal: 77,4 L. Concentração de proteína total no extrato microsomal: 1,55 mg/mL. O experimento foi conduzido a 30 °C.

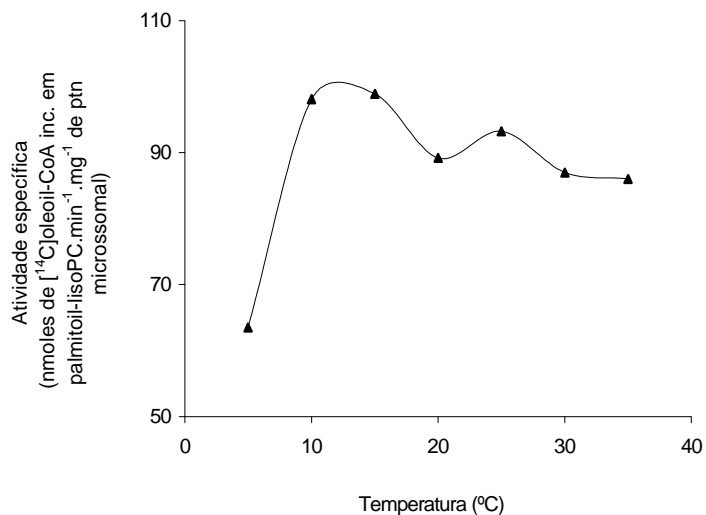


Figura 6 – Efeito da temperatura sobre a formação de fosfatidilcolina-[¹⁴C]oleoil, catalisada pela lisofosfatidilcolina aciltransferase de sementes de soja. Condições experimentais: tampão Tricina-KOH $6 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$, pH 8,0; CDP-colina $4 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$; e CDP-[¹⁴C]colina $4 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$. Quantidade de extrato microsomal: 92,3 L. Concentração de proteína total no extrato microsomal: 1,30 mg/mL. A mistura reacional foi incubada por um período de cinco minutos.

3.2.3. Determinação dos parâmetros cinético-enzimáticos K_{mapp} e V_{maxapp} , para lisofosfatidilcolina aciltransferase

Na Figura 7, apresenta-se o gráfico de Michaelis-Menten para formação de fosfatidilcolina- $[^{14}C]$ oleoil, catalisada pela lisofosfatidilcolina aciltransferase. Nessa figura está inserido o gráfico de duplo-recíproco (LINEWEAVER-BURK, 1934). Observa-se que essa enzima segue a cinética de Michaelis-Menten, produzindo curva hiperbólica de velocidade *versus* concentração de substrato.

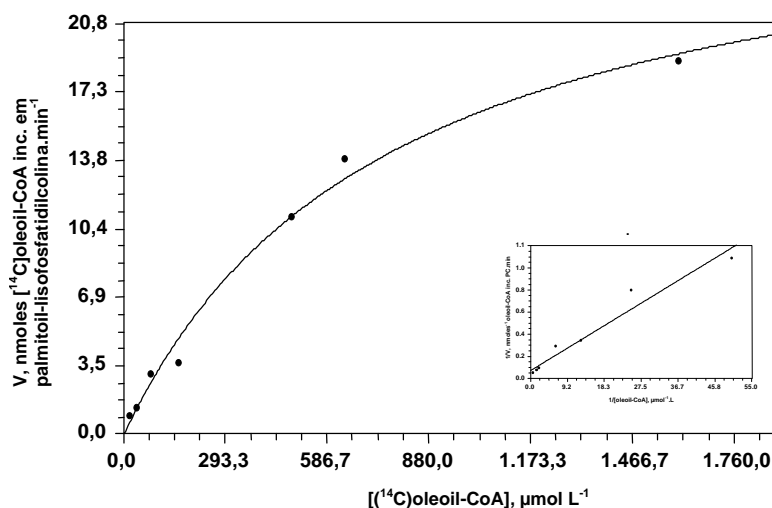


Figura 7 – Gráfico de Michaelis-Menten para formação de fosfatidilcolina- $[^{14}C]$ oleoil, catalisada pela lisofosfatidilcolina aciltransferase de sementes de soja. Condições experimentais: tampão fosfato $1 \times 10^{-1} molL^{-1}$, pH 7,2; oleoil-CoA 2 a $1.600 \times 10^{-5} molL^{-1}$; $[^{14}C]oleoil-CoA$ $3,4 \times 10^{-6} molL^{-1}$; e palmitoil-lisofosfatidilcolina $1 \times 10^{-4} molL^{-1}$. Quantidade de extrato microsomal: 45,5 μL . Concentração de proteína total no extrato microsomal: 2,64 mg/mL. O experimento foi conduzido a 30 $^{\circ}C$, durante cinco minutos. A linha contínua foi traçada com base em pontos teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten, para obtenção de K_{mapp} e V_{maxapp} . Os pontos são experimentais. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk.

Os valores dos parâmetros cinéticos K_{Mapp} e V_{maxapp} , calculados para formação dos produtos, estão no Quadro 2.

Quadro 2 – Parâmetros cinéticos $K_{m_{app}}$ e $V_{max_{app}}$, para formação de fosfatidilcolina-[^{14}C]oleoil catalisada pela lisofosfatidilcolina aciltransferase de sementes de soja, obtida por meio de regressão não-linear, utilizando-se o programa de computação Enzifitter (LEATHERBARROW, 1987)

LISOFOSFATIDILCOLINA ACILTRANSFERASE	
$K_{m_{app}}$	$7,6 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$
$V_{max_{app}}$	28 nmoles de [^{14}C]oleoil incorporada em palmitoil-lisofosfatidilcolina. min^{-1}

De acordo com MOREAU e STUMPF (1982), a lisofosfatidilcolina aciltransferase de açafirão possui um $K_{m_{app}}$ para oleoil-CoA de aproximadamente $0,95 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Assim, essa enzima possui maior afinidade pelo substrato oleoil-CoA, ou seja, ocorre melhor adaptação do substrato ao centro ativo da lisofosfatidilcolina aciltransferase de açafirão.

3.3. Determinação da atividade da colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase em sementes de soja, produzidas em temperaturas de 34/28 e 22/13 °C – dia/noite

As enzimas que controlam a biossíntese de ácidos graxos, para produção do óleo nas sementes de soja, são sensíveis à temperatura durante o tempo de deposição do óleo (WILCOX e CAVINS, 1992). No entanto, tais enzimas e o mecanismo de sua regulação, induzido pela temperatura, estão sob investigação.

Com base nessas informações, a atividade da colinafosfotransferase e da lisofosfatidilcolina aciltransferase foi avaliada, nos diversos estádios de desenvolvimento da semente de soja da variedade comercial – CAC-1 e da linhagem mutante – CC4, ambas crescidas em duas condições de temperatura: 22/13 e 34/28 °C – dia/noite.

Para determinação da atividade da colinafosfotransferase e da lisofosfatidilcolina aciltransferase, foram utilizados os dados cinético-enzimáticos obtidos no experimento anterior. Para efeito de comparação, a análise das atividades de ambas as enzimas foi feita a 30 °C.

Nas Figuras 8a e b e 9a e b, apresentam-se as atividades da colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase, nos diversos estádios do desenvolvimento da semente de soja da variedade CAC-1 e da linhagem CC4, respectivamente.

A atividade da colinafosfotransferase foi mais elevada em plantas cultivadas em condições de baixa temperatura, tanto na variedade CAC-1 quanto na linhagem CC4, nos seis estádios de desenvolvimento da semente, ou seja, durante todo o período de enchimento do grão de soja.

A colinafosfotransferase apresentou alta atividade durante todo o desenvolvimento do grão de soja, em ambos os genótipos. De acordo com SLACK et al. (1985), a atividade da colinafosfotransferase, em sementes oleaginosas, é significativamente induzida durante o desenvolvimento da semente e concomitante ao acúmulo de triacilgliceróis.

Em ambos os genótipos, a atividade da lisofosfatidilcolina aciltransferase foi maior nas sementes produzidas em condições de baixa temperatura. Essa enzima apresentou maior atividade nos estádios iniciais de desenvolvimento da semente, época que coincide com a maior produção do ácido linolênico. De acordo com WANG e HILDEBRAND (1988), a produção de linolenato é regulada, em sementes de soja em desenvolvimento, durante todo o enchimento do grão, sendo mais alta nos estádios iniciais de formação da semente, com a quantidade relativa diminuindo nos estádios finais do desenvolvimento.

Esses resultados indicam que a colinafosfotransferase e a lisofosfatidilcolina aciltransferase, responsáveis pelo enriquecimento do óleo com ácidos graxos polinsaturados, apresentaram-se mais ativas em baixas temperaturas e, por conseqüência, poderiam estar sendo reguladas, em nível transcricional ou pós-traducional, pela temperatura. Fato observado também por CHEESBROUGH (1989), que relatou que a atividade da colinafosfotransferase é regulada pela temperatura ambiente durante o desenvolvimento da semente. Eles descreveram aumento da atividade da mesma quando as plantas cresceram a uma temperatura de 20 °C, bem como diminuição da atividade na temperatura de 35 °C.

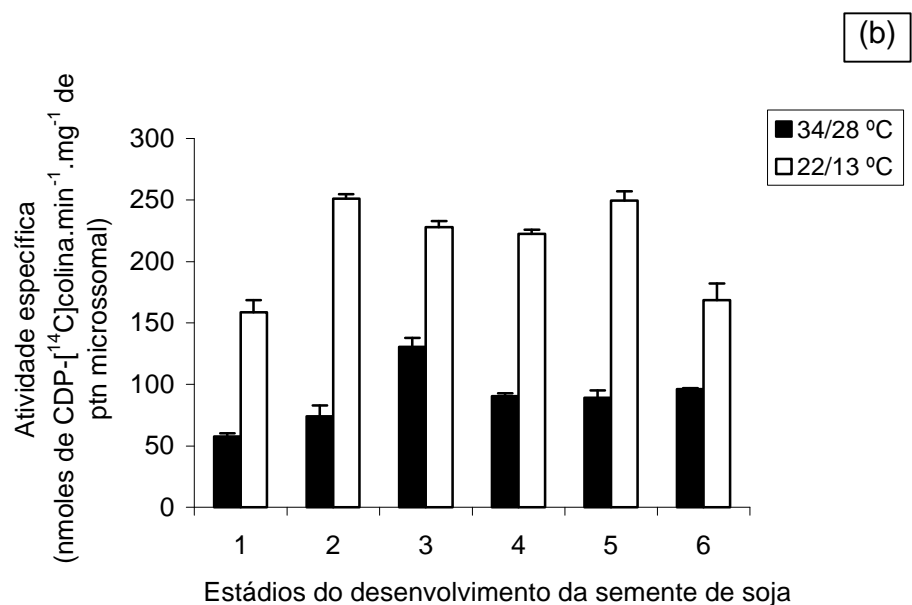
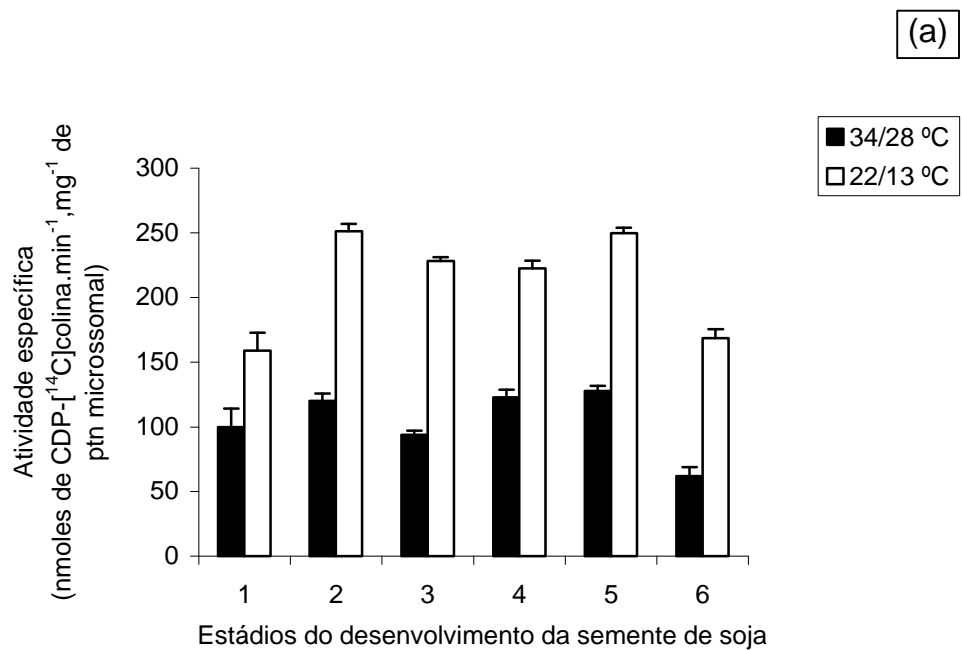


Figura 8 – Atividade da colinafosfotransferase de sementes de soja dos genótipos CAC-1 (a) e CC4 (b). As plantas foram cultivadas nas temperaturas de 34/28 °C e 22/13 °C (dia/noite). Estádios de desenvolvimento das sementes, com base no peso fresco: 1^o – 0 a 75 mg, 2^o – 76 a 150 mg, 3^o – 151 a 225 mg, 4^o – 226 a 300 mg, 5^o – 301 a 375 mg e 6^o – 376 a 450 mg.

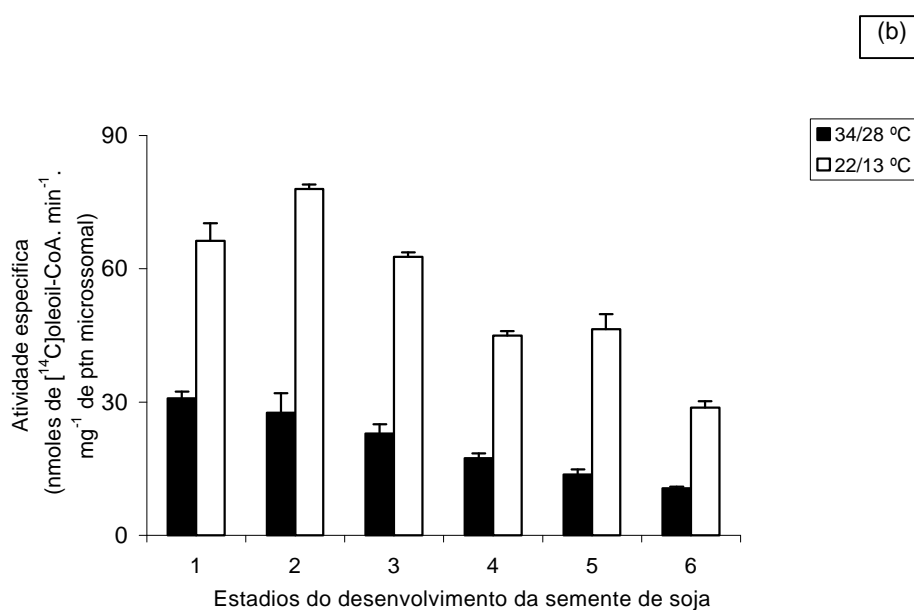
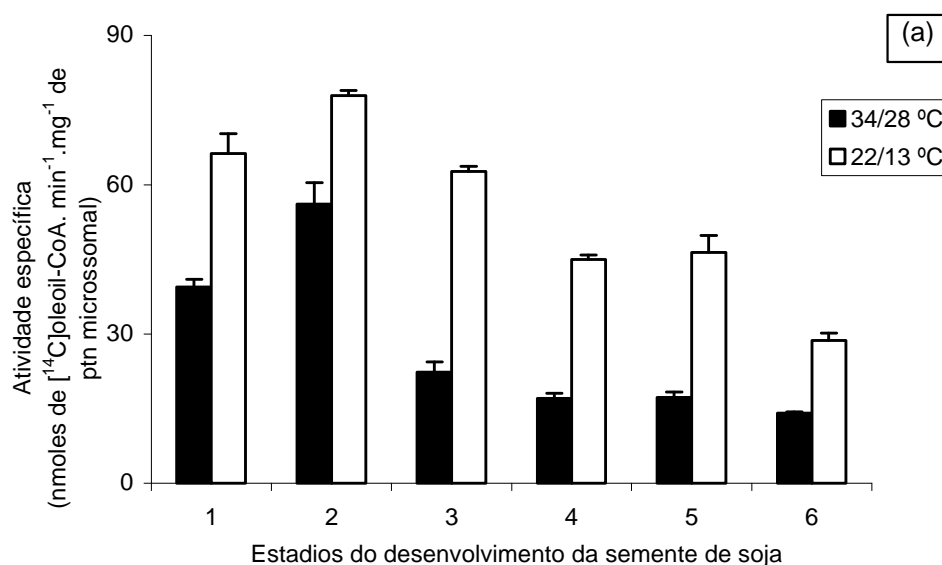


Figura 9 – Atividade da lisofosfatidilcolina aciltransferase de sementes de soja dos genótipos CAC-1 (a) e CC4 (b). As plantas foram cultivadas nas temperaturas de 34/28 °C e 22/13 °C (dia/noite). Estádios de desenvolvimento da semente, com base no peso fresco: 1^o – 0 a 75 mg, 2^o – 76 a 150 mg, 3^o – 151 a 225 mg, 4^o – 226 a 300 mg, 5^o – 301 a 375 mg e 6^o – 376 a 450 mg.

Comparando as atividades da colinafosfotransferase e da lisofosfatidilcolina aciltransferase, entre os genótipos, foi observado que, em baixa temperatura, a colinafosfotransferase da semente de soja da variedade CAC-1 mostrou-se mais ativa em praticamente todos os estádios de desenvolvimento. O mesmo comportamento foi observado com relação à atividade da colinafosfotransferase quando as plantas foram cultivadas em alta temperatura.

Com relação à atividade da lisofosfatidilcolina aciltransferase, observou-se que ela foi maior nas sementes de soja da variedade CAC-1 do que nas sementes da linhagem CC4, em baixa temperatura. Em alta temperatura, a atividade foi superior somente nos dois primeiros estádios de desenvolvimento; nos últimos, a atividade tendeu a ser semelhante. Portanto, esses resultados, adicionados àqueles associados com a composição de ácidos graxos no óleo de soja, evidenciam que a planta de soja responde à variação ambiental (decréscimo da temperatura) com o aumento de ácidos graxos polinsaturados, os quais podem estar em maior concentração devido ao aumento das atividades da colinafosfotransferase e da lisofosfatidilcolina aciltransferase.

Além disso, a variedade CAC-1 apresentou tanto maior variação no nível do ácido linolênico quanto na atividade das enzimas, indicando que a linhagem CC4, derivada da variedade CAC-1, apresenta maior estabilidade na composição do óleo em condições adversas de temperatura.

A influência da temperatura de crescimento das plantas sobre as atividades da colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase nas sementes de soja em desenvolvimento pode ser observada no Quadro 3.

Observou-se que ocorre interação entre genótipo x ambiente com relação a ambas as características, em que a atividade das duas enzimas diferiram nas duas condições de temperatura analisadas.

Quadro 3 – Atividade específica da colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase em sementes de soja da variedade CAC-1 e linhagem CC4, produzidas nas temperaturas de 22/13 °C e 34/28 °C (dia/noite). As atividades foram detectadas após cinco minutos de reação a 30 °C

Temperatura (°C, dia/noite)	Colinafosfotransferase		Lisofosfatidilcolina aciltransferase	
	nmoles de CDP-[¹⁴ C]colina inc. em DAGs. min ⁻¹ . mg ⁻¹ de ptn microssomal		nmoles de [¹⁴ C]oleiol.CoA inc.em LFC. min ⁻¹ . mg ⁻¹ de ptn microssomal	
	CC4	CAC-1	CC4	CAC-1
22/13	166,88	213,06	43,01	54,50
34/28	89,67	104,40	20,54	27,71

DAG- diacilgliceróis e LFC – lisofosfatidilcolina.

4. CONCLUSÃO

Um melhor entendimento dos mecanismos bioquímicos e genéticos operativos no controle das quantidades relativas dos principais ácidos graxos pode facilitar o desenvolvimento de variedades com conteúdo proporcional de ácidos graxos que atenda melhor a indústria de derivados da soja. Estudos têm dado maior enfoque às dessaturases, enzimas envolvidas na introdução de duplas ligações às moléculas de ácidos graxos. No entanto, neste trabalho mostrou-se que as enzimas colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase, responsáveis por disponibilizar ácidos graxos polinsaturados para a biossíntese de triacilgliceróis, podem, também, ter papéis relevantes, pois apresentaram elevadas atividades quando as plantas foram cultivadas em baixa temperatura.

Em particular, a enzima lisofosfatidilcolina aciltransferase pode ter sido a maior responsável por enriquecer o óleo de soja com ácidos graxos polinsaturados, devido ao fato de existirem isoformas de lisofosfatidilcolina aciltransferase apresentando alta atividade em baixas temperaturas (pico de atividade entre 10 e 15 °C). Dessa forma, essa enzima pode ter participação efetiva em aumentar o conteúdo de ácidos graxos polinsaturados para garantir maior fluidez dos lipídeos de reserva quando sementes de soja são produzidas em condições de baixa temperatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARONDEL, V.; LEMIEUX, B.; HWANG, I.; GIBSON, S.; GOODEMAN, H. M.; SOMERVILLE, C. R. Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis*. **Science**, v. 258, p. 1353-1354, 1992.
- BROWSE J. A.; SLACK, C. R. Catalase stimulates linoleate desaturase activity in microsomes from developing linseed cotyledons. **FEBS LETTERS**, v. 131, p. 111-114, 1981.
- BYRUM, J. R.; KINNEY, A. R.; STECCA, K. L.; GRACE, D. J.; DIERS, B. W. Alteration of the omega-3 fatty acid desaturase gene is associated with reduced linolenic acid in the A5 soybean genotype. **Theor Appl Genet**, v. 94, p. 356-359, 1997.
- CHEESBROUGH, T. M. Changes in the enzymes for fatty acid synthesis and desaturation during acclimation of developing soybean seeds to altered growth temperature. **Plant Physiology**, v. 90, p. 760-764, 1989.
- CHERRY, J. H.; BISHOP, L.; HASEGAWA, P. M.; LEFFLER, H. R. Differences in the fatty acid composition of soybean seed produced in northern and southern areas of the U.S.A. **Biochemistry**, v. 24, p. 237-241, 1985.
- CORNELL, R.; MacLENNAN, D. H. Solubilization and reconstitution of cholinephosphotransferase from sarcoplasmic reticulum: stabilization of solubilized enzyme by diacylglycerol and glycerol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 821, p. 97-105, 1985.
- DEWEY, R. E.; WILSON, R. F.; NOVITZKY, W. P.; GOODE, J. H. The AAPT1 gene of soybean complements a cholinephosphotransferase-deficient mutant of yeast. **Plant Cell**, v. 6, p. 1495-1507, 1994.

- GENNITY, J. M.; STUMPF, P. K. Studies of the Δ^{12} desaturase of *Carthamus tinctorius* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 239, p. 444-454, 1985.
- GRIFFITHS, G.; STOBART, A. K.; STYMNE, S. The acylation of sn-glycerol 3-phosphate and the metabolism of phosphatidate in microsomal preparations from the developing cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. **Biochemistry Journal**, v. 230, p. 379-388, 1985.
- GRIFFITHS, G.; STYMNE, S.; STOBART, A.K. The utilisation of fatty-acid substrates in triacylglycerol biosynthesis by tissue-slices of developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) cotyledons. **Planta**, v. 173, p. 309-316, 1988.
- HAMADA, T.; KODAMA, H.; TAKESHITA, K.; UTSUMI, H.; IBA, K. Characterization of transgenic tobacco with an increased α -linolenic acid level. **Plant Physiology**, v. 118, p. 591-598, 1998.
- HARWOOD, J. L. Synthesis of molecular species of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine by germinating soya bean. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1459-1463, 1976.
- HEPPARD, E. P.; KINNEY, A. J.; STECCA, K. L.; MIAO, G. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal ω -6 desaturase genes in soybeans. **Plant Physiology**, v. 110, p. 311-319, 1996.
- KINNEY, A. J. Development of genetically engineered soybean oils for food applications. **Journal of Food Lipids**, v. 3, p. 273-292m, 1996.
- LEATHERBARROW, R. J. **Enziffiter manual**. London: Biosoft, 1987. p. 13-42.
- LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal American Chemistry Society**, v. 56, p. 658-666, 1934.
- MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die kinetic der invertinwirkung. **Biochem. Z.**, v. 49, p. 333-369, 1913.
- MOORE JR., T. S. Phosphatidylcholine synthesis in castor bean endosperm. **Plant Physiology**, v. 57, p. 383-386, 1976.
- MOREAU, R. A.; STUMPF, P. K. Solubilization and characterization of an acyl-coenzyme A. **Plant Physiology**, v. 69, p. 1293-1297, 1982.
- NISHIDA, I.; MURATA, N. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 541-568, 1996.
- OHLROGGE, J. B.; BROWSE, J.; SOMERVILLE, C. R. The genetics of plant lipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1082, p. 1-26, 1991.

- RAHMAN, S. M.; TAKAGI, Y.; KUBOTA, K.; MIYAMOTO, K.; KAWAKITA, T. High oleic acid mutant in soybean induced by X-ray irradiation. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 58, p. 1070-1072, 1994.
- SLACK, C. R.; ROUGHAN, P. G.; BROWSE, J. Evidence for an oleoyl phosphatidylcholine desaturase in microsomal preparations from cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. **Biochemistry Journal**, v. 179, p. 649-656, 1979.
- SLACK, C. R.; CAMPBELL, L. C.; BROWSE, J. A.; ROUGHAN, G. Some evidence for the reversibility of the cholinephosphotransferase-catalysed reaction in developing linseed cotyledons in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 754, p. 10-20, 1983.
- SLACK, C. R.; ROUGHAN, J. A.; BROWSE, J. A.; GARDINER, S. E. Some properties of cholinephosphotransferase from developing safflower cotyledons. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 833, p. 438-448, 1985.
- SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARDNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLEN, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.
- SOMERVILLE, C.; BROWSE, J. Plant Lipids: metabolism, mutants and membranes. **Science**, v. 252, p. 80-87, 1991.
- STOBART, A.; STYMNE, S.; GLAD, G. The synthesis of linoleate and phosphatidic acid and its relationship to oil production in the microsomes of developing seeds of safflower (*Carthamus tinctorius* L. var. GILA). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 754, p. 292-297, 1983.
- STOBART, A. K.; STYMNE, S. The regulation of the fatty-acid composition of the triacylglycerols in microsomal preparations from avocado mesocarp and the developing cotyledons of safflower. **Planta**, v. 163, p. 119-125, 1985.
- STYMNE, S.; STOBART, A. K.; GLAD, G. The role of the acyl-CoA pool in the synthesis of polyunsaturated 18-carbon fatty acids and triacylglycerol production in the microsomes of developing safflowers seeds. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 752, p. 198-208, 1983.
- STYMNE, S.; STOBART, A. K. Evidence for the reversibility of the acyl-CoA: lysophosphatidylcholine acyltransferase in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cotyledons and rat liver. **Biochemistry Journal**, v. 223, p. 305-314, 1984.
- STYMNE, S.; STOBART, A. K. Oil synthesis in vitro in microsomal membranes from developing cotyledons of *Linum usitatissimum* L. **Planta**, v. 164, p. 101-104, 1985.

- VOGEL, G.; BROWSE, J. Preparation of radioactively labeled synthetic sn-1,2-diacylglycerols for studies of lipid metabolism. **Analytical Biochemistry**, v. 224, p. 61-67, 1995.
- VOGEL, G.; BROWSE, J. Cholinephosphotransferase and diacylglycerol acyltransferase. **Plant Physiology**, v. 110, p. 023-931, 1996.
- YADAV, N. S. Genetic modification of soybean oil quality. In: VERMA, D. P. S.; SHOEMAKER, R. C. (Eds.). **Soybean genetics, molecular biology and biotechnology**. USA: CAB INTERNATIONAL, 1996. p. 127-188.
- WANG, X. M.; HILDEBRAND, D. F. Biosynthesis and regulation of linolenic acid higher plants. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 26, p. 77-792, 1988.
- WILCOX, J. R.; CAVINS, J. F. Normal and low linolenic acid soybean strains: response to planting date. **Crop Science**, v. 32, p. 1248-1251, 1992.
- WOLF, R. B.; CANVINS, J. F.; KLEIMAN, R.; BLACK, L. T. Effect of temperature on soybean seed constituents: oil, protein, moisture, fatty acids, amino acids and sugars. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 59, p. 230-232, 1982.

CAPÍTULO III

EFEITO DA TEMPERATURA NA EXPRESSÃO DO GENE QUE CODIFICA COLINA FOSFOTRANSFERASE EM SEMENTES DE SOJA

1. INTRODUÇÃO

Óleo de soja, como alguns outros óleos vegetais, é composto quase que exclusivamente de triacilgliceróis, que são definidos quimicamente como compostos que possuem três moléculas de ácidos graxos esterificadas aos grupos hidroxilas da molécula de glicerol. Os principais ácidos graxos encontrados no óleo de soja comercial são: ácido palmítico (11%) e ácido esteárico (4%), ácidos graxos saturados e ácido oléico (21%), ácido graxo monoinsaturado e ácido linoléico (53%) e ácido linolênico (8%) e ácidos graxos polinsaturados (com duas e três duplas ligações, respectivamente). Ácidos graxos polinsaturados, disponíveis após a hidrólise das moléculas dos triacilgliceróis, são essenciais na dieta dos mamíferos; entretanto, são facilmente oxidáveis, diminuindo a qualidade nutricional do óleo.

O conteúdo de ácidos graxos polinsaturados é o mais importante determinante da qualidade do óleo (BRUNER et al., 2001), e, portanto, existe um considerável interesse em se modificar a composição do óleo por melhoramento tradicional ou pelo uso de novas técnicas de biologia molecular. Para tanto, modificações genéticas na composição do óleo de culturas

oleaginosas já estão sendo obtidas, em vários laboratórios, com o objetivo de produzir óleos com atributos nutricionais e funcionais desejáveis (WANG e HILDEBRAND, 1988; OSÓRIO et al., 1995; KINNEY, 1996).

A composição relativa desses ácidos tanto nos lipídeos de membrana quanto nos de reserva varia com a temperatura de crescimento da cultura. Em uma ampla variedade de organismos, o grau de insaturação dos ácidos graxos aumenta quando o organismo é exposto à baixa temperatura, ou seja, existe correlação inversa entre o teor de ácidos graxos polinsaturados e a temperatura de crescimento (SOMERVILLE e BROWSE, 1991).

Programas de melhoramento com o objetivo de elevar teores de ácidos graxos específicos no óleo, por meio de mutagênese química e, ou, física, têm sido conduzidos com sucesso em diversas espécies, incluindo linho, soja e canola (URIE, 1985; TONNET e GREEN, 1987; OHLROGGE et al., 1991; KINNEY, 1994 e 1996). Para essas espécies, a modificação resulta da presença de, no mínimo, um alelo que inibe a produção de uma enzima do metabolismo de ácidos graxos, levando ao acúmulo de produtos intermediários no óleo (MIQUEL e BROWSE, 1994). Exemplos incluem linhagens mutantes de soja com baixo teor de ácido linolênico (18:3): C1640 (3–4%), cujo conteúdo reduzido em ácido linolênico é controlado por um alelo no *locus fan*; A5 (alto teor de ácido oléico – ~ 40% e baixo de ácido linoléico); e A23 (conteúdo de 2% em ácido linolênico), os quais, após o cruzamento, originaram os mutantes A16 e A17 (o primeiro com conteúdo normal de ácido palmítico e baixo conteúdo de ácido linolênico – ~ 2,2% e, o segundo, com alto conteúdo de ácido palmítico e baixo conteúdo de ácido linolênico- ~ 2,4%) (WILCOX e CAVINS, 1986; RENNIE e TANNER, 1991; OHROGGE et al., 1991; RAHMAN et al., 1994; BYRUM et al., 1997).

De acordo com KINNEY (1994), esses mutantes variaram seus conteúdos de ácido linolênico em função da temperatura de crescimento; por exemplo, quando plantas de soja da linhagem C1640 (mutante *fan*) cresceram à temperatura de 40/30 °C – dia/noite, o conteúdo de ácido linolênico nos triacilgliceróis da semente foi de 2%, enquanto à temperatura de 15/12 °C – dia/noite esse conteúdo alterou-se para 8%. Embora genes de efeitos maiores estejam envolvidos no controle de baixo teor de linolênico, os resultados do trabalho de FEHR et al. (1992) indicam que genes de efeitos menores, além

dos efeitos ambientais, são importantes na determinação do conteúdo desse ácido. Como consequência, redução no conteúdo de ácido linolênico pode ser considerada uma característica quantitativa em programas de desenvolvimento de cultivar.

Adicionalmente, melhoramento genético para modificar a composição de ácidos graxos tem se efetuado pelo isolamento de genes que codificam enzimas específicas no metabolismo de lipídeos. Exemplos incluem a expressão anti-senso, semente-específica, do gene que codifica para Δ^9 dessaturase (estearil-ACP dessaturase) para aumentar os níveis de ácido esteárico (~ 40%) em sementes oleaginosas de duas espécies de *Brassica* (KNUTZON et al., 1992); expressão, semente-específica, de uma tioesterase carreadora de ácidos graxos de cadeia média (ácido láurico e ácido mirístico) em semente de *Arabidopsis thaliana* e *Brassica napus* (VOELKER et al., 1992); expressão anti-senso do gene que codifica para Δ^3 dessaturase (linoleoil dessaturase), com baixo teor de ácido linolênico (1,5%) e Δ^6 dessaturase (oleoil dessaturase), com conteúdo menor de ácido linoléico e maior de ácido oléico (~ 80%), em sementes de soja (KINNEY, 1994).

Desse modo, alelos mutantes (ou expressão anti-senso constitutiva nas seqüências de genes envolvidos na biossíntese de lipídeos) em soja e em outras culturas oleaginosas de interesse podem diminuir consideravelmente os níveis de ácidos graxos polinsaturados em tecidos vegetais e em sementes. Entretanto, tais modificações podem ser cruciais para a sobrevivência da planta: mutações no gene *fad 2* (*locus* da oleoil dessaturase) em *Arabidopsis* não afetam o crescimento vegetativo dos mutantes a 22 °C, mas estes não sobrevivem a 6 °C (MIQUEL et al., 1993). Nessa e em diversas outras espécies, mutações que alteram a composição de ácidos graxos nas sementes levam a modificações associadas nos lipídeos de tecidos vegetativos (WANG et al., 1989; LEMIEUX et al., 1990), e isso significa que a regulação molecular específica da expressão do gene em sementes (por exemplo, o uso de promotores específicos de semente para controle da expressão de seqüências anti-sensos) é uma técnica essencial e possível para produzir sementes oleaginosas modificadas em algumas culturas (MIQUEL e BROWSE, 1994). No entanto, variedades de girassol, ricas em oleato, que foram obtidas por mutagênese química, estão sendo produzidas comercialmente (URIE, 1985),

indicando que nessa espécie a eliminação de lipídeos polinsaturados de tecidos de sementes não tem efeito substancial na biologia da semente (MIQUEL e BROWSE, 1994).

De acordo com ALONSO e MAROTO (2000), a expressão do transgene em tecido específico é de importância singular, pois a expressão constitutiva de alguns transgenes de ácidos graxos tem sido prejudicial para a "performance" do organismo, especialmente em certas condições. Essas circunstâncias podem invalidar o uso de plantas transgênicas como veículo de produção; e grandes esforços são necessários para assegurar a expressão correta (por exemplo, em sementes) sem outros efeitos adversos.

Na tentativa de buscar respostas a respeito da regulação da quantidade de ácidos graxos polinsaturados no óleo de soja e considerando que a atividade da colinafosfotransferase foi significativamente elevada em sementes de soja produzidas em baixa temperatura, este trabalho teve como objetivo analisar o padrão de amplificação do cDNA da colinafosfotransferase por RT-PCR, bem como o acúmulo de transcritos da mesma, pela técnica de *Northern blot*, a fim de verificar se a regulação ocorre em nível transcricional.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

Sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) do cultivar comercial CAC-1 e da linhagem CC4, derivada desse cultivar, foram utilizadas neste experimento. CAC-1 possui teor normal do ácido linolênico (8%), enquanto CC4 possui baixo teor (3%).

A linhagem CC4 é resultante do cruzamento entre a variedade comercial CAC-1 e o acesso BARC-12. Este acesso, com menos de 3% do ácido linolênico, foi desenvolvido pelo USDA-ARS em Beltsville, Maryland (EUA). Esse acesso foi cruzado com o cultivar comercial CAC-1, obtendo-se a geração F1. As plantas F1 foram autofecundadas, produzindo a geração F2. Sementes F2 selecionadas para baixo teor de ácido linolênico foram plantadas em casa de vegetação e retrocruzadas com CAC-1. Tal procedimento de retrocruzamento, seguido de autofecundações e seleção de sementes, foi realizado até o terceiro ciclo de retrocruzamento, produzindo, dessa forma, linhagens quase isogênicas (RC3F4) de CAC-1, que apresentam baixo teor de ácido linolênico. Essas linhagens fazem parte do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa, que visa à criação de germoplasma para sua maior aceitabilidade na alimentação humana, bem como maior estabilidade oxidativa do óleo.

As plantas foram cultivadas no período de maio a setembro de 2000. Até o início do período reprodutivo, foram crescidas a uma temperatura média diária de 31 °C e, então, transferidas para duas casas de vegetação: uma com sistema de ventilação, em que a temperatura máxima média foi de 22 °C e a temperatura mínima, média de 13 °C. Na outra, com sistema de aquecimento artificial, as temperaturas máxima e mínima médias foram de 34 e 28 °C, respectivamente. As medidas de temperatura, por meio de um higrômetro, foram feitas diariamente, às 17 h.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por planta por ambiente de temperatura, totalizando 45 vasos com capacidade para 4,0 kg de solo.

As sementes foram coletadas em um período de aproximadamente três meses, separadas em seis estádios de desenvolvimento, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C, para posteriores análises.

A detecção do mRNA correspondente à colinafosfotransferase por RT-PCR e *Northern blot* foi realizada nos seis estádios de desenvolvimento, os quais foram definidos com base no peso fresco da sementes: 1º – 0 a 75 mg, 2º – 76 a 150 mg, 3º – 151 a 225 mg, 4º – 226 a 300 mg, 5º – 301 a 375 mg e 6º – 376 a 450 mg. Esses estádios compreenderam, praticamente, todo o período de enchimento do grão, com o último estágio precedendo a maturidade fisiológica da semente. No mínimo, 100 sementes por estágio foram coletadas.

2.2. Extração de RNA total

O RNA total foi extraído das sementes coletadas em todos os estádios de desenvolvimento, de acordo com SAMBROOK et al. (1989), porém com algumas adaptações ao protocolo original. Todas as etapas de extração do RNA total foram efetuadas a 4 °C e em condições livres de ribonuclease (RNase). O protocolo modificado é descrito a seguir:

Aproximadamente 4 g de sementes, de cada estágio de desenvolvimento, foram macerados em nitrogênio líquido e transferidos para tubos Falcon de 50 mL. A cada amostra foram adicionados 18 mL de tampão NTES (NaCl 0,1 molL⁻¹; TRIS-HCl 0,01 molL⁻¹, pH 7,5; EDTA 1 mmolL⁻¹; e SDS 1%), 6 mL de fenol e 6 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após

agitação vigorosa por 15 minutos, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos. A fase orgânica foi descartada, e à fase aquosa foram adicionados 1/10 do seu volume de acetato de sódio 2 molL⁻¹ e dois volumes de etanol. A mistura foi homogeneizada e deixada por uma hora a – 20 °C. O RNA foi precipitado e coletado por centrifugação a 12.000 g, por 15 minutos. O precipitado foi lavado em etanol 70%, ressuspensão em 2,5 mL de água DEPC e centrifugado a 7.500 g, por cinco minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 2,5 mL de LiCl 4 mol.L⁻¹. A mistura foi homogeneizada e colocada em repouso a 4 °C. Após 12 horas, a mistura foi centrifugada a 12.000 g por 30 minutos e o *pellet*, ressuspensão em 1,8 mL de água DEPC (água tratada com dietilpirocarbonato). A essa solução foram adicionados 0,2 mL de acetato de sódio 2 molL⁻¹ e 3,6 mL de etanol. A mistura foi agitada e deixada em repouso por aproximadamente cinco horas a –20 °C. Em seguida, foi centrifugada a 12.000 g por cinco minutos, e ao precipitado foi adicionado etanol 70% para lavagem e total descontaminação. O etanol foi descartado e ao *pellet*, totalmente seco, foram adicionados 600 µL de água DEPC. Alíquotas de 150 µL de solução de RNA total foram divididas em microtubos e armazenadas a – 80 °C até o uso.

A integridade do RNA total isolado foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2%, contendo 0,1 mg/mL de brometo de etídio. A presença de duas bandas bem distintas indica a preservação dos RNA ribossômicos 18S e 28S, forte indício de que não há degradação apreciável das amostras de RNA.

A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro a 260 nm e a concentração, estimada pela fórmula: [RNA]µg/µL= (A₂₆₀*f*40)/1.000, em que f é o fator de diluição (SAMBROOK et al., 1989).

2.3. Síntese da primeira fita de cDNA

A fita de cDNA inicial foi sintetizada pela enzima transcriptase reversa a partir de RNA total, utilizando-se o kit *Super ScriptTM Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis*, da *Life Technologies*, que se baseia no protocolo de SOKOLOV e PROCKOP (1994). O método de iniciação da primeira fita de cDNA empregado foi o que utiliza o *primer* oligo-dT₁₂₋₁₈, que parecia à cauda poli A+, presente na maioria dos mRNAs eucarióticos.

A transcrição reversa do mRNA poli A+ foi realizada em reações de 20 μL , contendo: 10 μg de RNA total tratado com a enzima *RQ1 DNase I* (*Promega*); 0,5 μg de *primers* oligo-dT₁₂₋₁₈; 1 μL da mistura de desoxinucleosídeos trifosfatados 10 mmolL^{-1} ; 2 μL MgCl_2 25 mmolL^{-1} , 2 μL de ditioneitol (DTT) 0,1 molL^{-1} ; e 200 unidades de transcriptase reversa. Inicialmente, o oligonucleotídeo específico e o RNA total sofreram uma desnaturação a 70 °C por 10 minutos. Em seguida, foram acrescentados os demais componentes da reação, que foi mantida a 42 °C por cinco minutos, para ocorrer a transcrição reversa, e, posteriormente, a 70 °C por 15 minutos, para inativação da enzima. Finalmente, após a adição de 1 μL (4 unidades) de ribonuclease H, que degrada a fita de mRNA do híbrido cDNA:mRNA, as amostras foram incubadas a 37 °C por 20 minutos e armazenadas a -20 °C até o momento de uso.

Como o RNA total pode conter pequenas quantidades de DNA genômico que podem ser amplificados com o cDNA-alvo, para cada reação foi feito um controle sem transcriptase reversa (RT-). Esse procedimento permitiu avaliar o sucesso do tratamento com a DNase I e determinar se dado fragmento foi originado a partir do DNA genômico ou do cDNA.

A técnica de RT-PCR foi utilizada para obter fragmentos de cDNA específico do gene que codifica para colinafosfotransferase e para fazer uma avaliação de possíveis variações nos níveis de expressão desse gene. Para confirmar o resultado obtido no experimento de RT-PCR, o cDNA foi utilizado como sonda nos experimentos de *Northern blot*. O cDNA que foi amplificado para obtenção da sonda homóloga pertence às sementes da variedade CAC-1, no segundo estágio de desenvolvimento.

2.4. Construção dos oligonucleotídeos específicos

Oligonucleotídeos específicos foram construídos a partir da seqüência depositada no *GenBank*, que representa o cDNA da colinafosfotransferase (AAPT1) da semente de soja. O programa utilizado para construção dos oligonucleotídeos foi o *Primer3 Input Program*, que está disponível no seguinte endereço eletrônico:

http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primers3.html

(ROZEN e SKALETSKY, 1998). **Informações sobre os oligonucleotídeos específicos utilizados neste trabalho estão listadas a seguir:**

Aminoalcoolfosfotransferase: colinafosfotransferase

Seqüência dos oligonucleotídios específicos:

AAPT1-L: ATGGGAAGCAAGCTAGACGA

AAPT1-R: ATAATGCTCCCAGGTTGCAC

Tamanho da seqüência de cDNA depositada no *GenBank*: 1547 pb

Tamanho esperado para o fragmento RT-PCR: 188 pb

Referência da seqüência do cDNA de origem: DEWEY et al. (1994)

2.5. Amplificação e separação dos fragmentos RT-PCR

Para o par de oligonucleotídios específicos da colinafosfotransferase, foram otimizadas as condições da reação de PCR. A primeira fita de cDNA foi amplificada em uma mistura de reação de 25 μL , contendo: 10 μL da solução de cDNA obtido a partir da transcrição reversa com *primer* oligo-dT; 1 unidade de Taq DNA polimerase; dNTPs 10 mmolL^{-1} ; MgCl_2 25 mmolL^{-1} ; e 5 pmoles/ μL dos oligonucleotídios específicos. As reações de PCR foram realizadas em termociclador *PE Applied Biosystems*, modelo 9600. As condições de amplificação foram: um passo de 94 °C por três minutos; 35 ciclos a 94 °C por 30 s; 50 °C por um minuto e 72 °C por um minuto; e um passo final a 72 °C por sete minutos.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,5%, com tampão TBE 1X (tris-borato 90 mmolL^{-1} , EDTA 1 mmolL^{-1}), utilizando-se brometo de etídio na concentração de 1 $\mu\text{g}/50\text{ mL}$ de gel. As bandas foram visualizadas sob luz UV e os fragmentos, purificados do gel utilizando o *QIAquick Gel Extraction Kit (250)* (QIAGEN) e armazenados a -20 °C até o momento de uso.

2.6. Análise da expressão por *Northern Blot*

A técnica de *Northern Blot*, descrita originalmente por ALWINE et al. (1977 e 1979), foi utilizada para estimar a cinética de acúmulo do mRNA correspondente à colinafosfotransferase, em vários estádios do desenvolvimento da semente de soja. O protocolo utilizado para essa técnica foi o descrito por SAMBROOK et al. (1989), com as devidas adaptações para hibridização de cada sonda.

Amostras de RNA total (15 µg) nos seis estádios de desenvolvimento das sementes de soja da variedade CAC-1 e em cinco estádios de desenvolvimento das sementes de soja da linhagem CC4, cultivadas em alta e baixa temperaturas, foram fracionadas em gel de agarose desnaturante 1,2%, contendo formaldeído 37% (produto ativo) e tampão MOPS 1X (MOPS 20 mmolL⁻¹, acetato de sódio 5 mmolL⁻¹, EDTA 1 mmolL⁻¹, pH 8,0), sendo todas as condições livres de ribonuclease.

A cada amostra foram adicionados 25 L de tampão de corrida desnaturante (0,75 mL de formamida; 0,15 mL de MPOS 10X; 0,24 mL de formaldeído 37%; e 0,28 mL de corante – *loading buffer*). Essa mistura foi incubada por 15 minutos a 65 °C. Em seguida, foi resfriada em banho de gelo e adicionado 1 L de solução de brometo de etídio 10 mg.mL⁻¹. Tal mistura foi aplicada no gel, utilizando-se como tampão de corrida MOPS 1X, realizada a 40 volts por aproximadamente quatro horas, e após a eletroforese o gel foi fotografado em câmera Polaróide (modelo *Polaroid MP-4*) e incubado por 20 minutos em solução SSC 1X (cloreto de sódio 0,15 mmolL⁻¹, citrato de sódio 15 mmolL⁻¹, pH 7,0) à temperatura ambiente, sob agitação lenta. O gel foi, então, colocado sobre o aparato de transferência e o RNA, transferido por capilaridade para uma membrana de náilon, em solução de SSC 10X por 15 a 18 horas (SAMBROOK et al., 1989; AUSUBEL et al., 1998). Após a transferência, a membrana foi lavada em SSC 2X por um minuto, secada em papel-filtro, sendo o RNA imobilizado utilizando o *Stratalinker UV Crosslinker*, modelo 1800 (*Stratagene*). Esse aparelho tem a função de fixar ácidos nucléicos à membrana de nitrocelulose ou náilon. Durante o *crosslinking*, uma ligação co-valente se forma entre o grupo amino do náilon e a timina do DNA ou uracila do RNA, a uma energia de 120.000 J/cm², utilizando-se uma

lâmpada de luz UV de 254 nm. As membranas foram armazenadas adequadamente até o momento de uso.

2.6.1. Marcação da sonda

A reação de marcação foi feita pelo método do *random primers*, segundo as recomendações do Kit *Prime-It II – Random Primers Labeling* (*Stratagene*): foram utilizados 10 μ L de *random primers*, 20 μ L de DNA (35 ng/ μ L) e 4 μ L de água deionizada. Essa mistura foi aquecida por cinco minutos a 95 °C e, em seguida, resfriada em banho de gelo. Após esse procedimento, foram adicionados 10 μ L de *primer buffer*, 2,5 μ L de [α -P³²] dATP (3000 Ci/nmol) e 1 μ L de fragmento de Klenow (5 unidades). Novamente, a mistura foi aquecida por 20 minutos a 37°, e em seguida 2 μ L de *stop mix* foram adicionados a essa mistura. Após o término da reação, as sondas marcadas foram armazenadas adequadamente a –20 °C até o momento de uso.

2.6.2. Hibridização

A solução de hibridização foi constituída de SSC 6X, SDS 0,5% e solução de Denhardt 5X (Ficoll 1% – tipo 400 (Pharmacia), polivinilpirrolidona 1% e albumina sérica bovina 1%).

A hibridização foi conduzida sob os seguintes parâmetros: 150 ng de sonda e 15 horas de hibridização a 58 °C. As condições de lavagem, após a hibridização, foram de um período de 20 minutos em solução de SSC 2X e SDS 0,1% e por dois períodos de 10 minutos, em solução de SSC 1X e SDS 0,1%, sendo todas as lavagens a 58 °C. O filme radiográfico (Kodak X-OMATIC) foi exposto por sete dias a –80 °C e, em seguida, revelado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existem diversos requerimentos básicos da engenharia metabólica de plantas para produção de sementes oleaginosas com modificações na fração óleo: (1) conhecimento da rota metabólica e, portanto, das enzimas/genes envolvidos; (2) clonagem de genes envolvidos na síntese de ácidos graxos polinsaturados; (3) disponibilidade de elementos cis-regulatórios (isto é, promotores tecido-específico); e (4) disponibilidade de métodos de transformação para culturas oleaginosas e estabilidade dos transgênicos (ALONSO e MAROTO, 2000). Dessa forma, após verificar que ocorreu aumento nos níveis de ácidos graxos polinsaturados em plantas cultivadas sob baixa temperatura (Capítulo I) e que a atividade da colinafosfotransferase também foi aumentada significativamente sob essa condição (Capítulo II), tornou-se importante entender o mecanismo de regulação dessa enzima. Em outras palavras, a alta atividade da colinafosfotransferase, em ambos os genótipos analisados quando cultivados em condições de baixa temperatura, pode ser devida a um aumento na síntese de moléculas da enzima ou a uma modificação pós-traducional nas moléculas, já existentes, dessa enzima. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de acúmulo de RNA pelas técnicas de RT-PCR e *Northern Blot*.

O par de oligonucleotídios desenhado com base na seqüência do gene da colinafosfotransferase, disponível no GenBank, gerou o fragmento RT-PCR específico com o tamanho esperado, demonstrando a eficiência dos

oligonucleotídios construídos e das condições empregadas para amplificação do cDNA. Esses oligonucleotídios foram utilizados na técnica de RT-PCR, para verificar possíveis variações nos níveis de expressão desse gene.

Na Figura 1, mostra-se que não houve diferença de amplificação do cDNA correspondente à colinafosfotransferase nas duas temperaturas de crescimento analisadas, no primeiro e sexto estádios de desenvolvimento das sementes da variedade CAC-1 e da linhagem CC4. Isso significa que os genótipos, independentemente da temperatura de crescimento, apresentaram bandas idênticas correspondentes à colinafosfotransferase, quando seu cDNA foi amplificado com os oligonucleotídios específicos.

A não-diferenciação do padrão de expressão gênica entre os genótipos cultivados em alta e baixa temperaturas, por RT-PCR, pode ser devida à alta sensibilidade da técnica, que permite a detecção de cDNAs correspondentes a mRNAs de baixo número de cópias. Assim, a técnica de RT-PCR, como feita, constitui-se de uma análise qualitativa (ausência ou presença do fragmento RT-PCR específico), e por esse motivo foi realizada a técnica de *Northern Blot*.

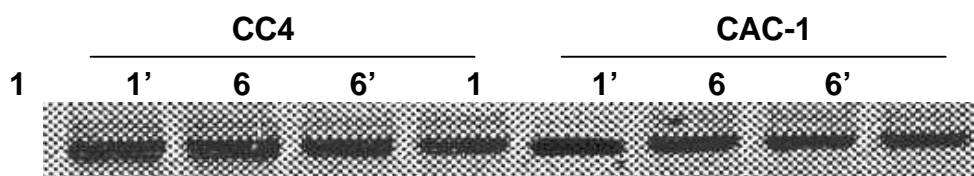


Figura 1 – Amplificação do cDNA da colinafosfotransferase pela técnica de RT-PCR. As linhas 1, 1', 6 e 6' correspondem ao cDNA da colinafosfotransferase de semente de soja da linhagem CC4 e da variedade CAC-1 no primeiro e sexto estádios de desenvolvimento, produzidas nas temperaturas de 34/28 e 22/13 °C (dia/noite), respectivamente.

Na Figura 2a, mostra-se o acúmulo dos transcritos da colinafosfotransferase, por *Northern Blot*, em sementes da variedade CAC-1 e da linhagem CC4, crescidas nas temperaturas de 34/28 e 22/13 °C (dia/noite).

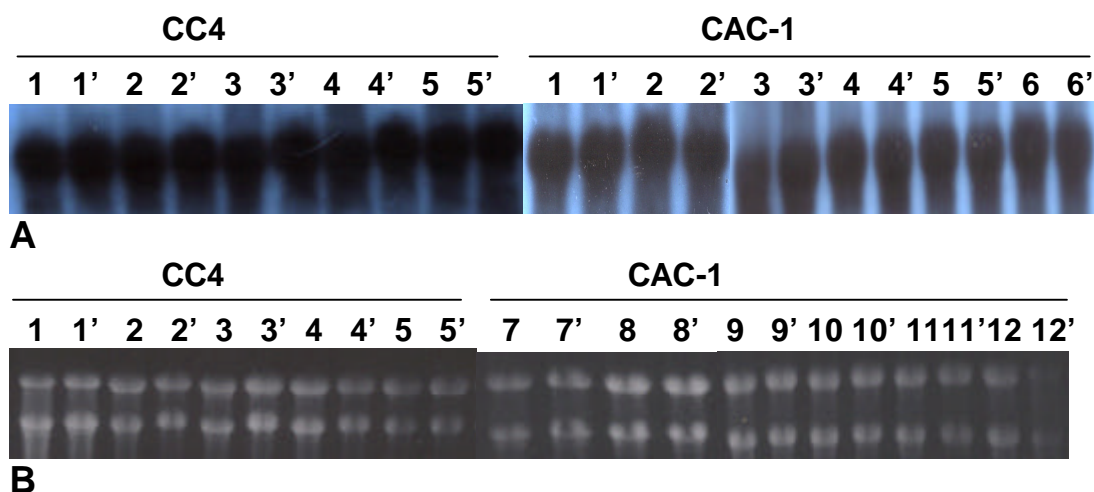


Figura 2 – **A)**: auto-radiografia da análise de *Northern Blot* para a sonda AAPT1. A membrana foi hibridizada com a sonda AAPT1, marcada com [$-P^{32}$]dATP, em condições de baixa estrigência. O tamanho aproximado da banda acima é de 188 pb. Em ambas as figuras, os números de 1 a 5 correspondem ao RNA total extraído de sementes de plantas do genótipo CC4, nos cinco estádios de desenvolvimento, cultivado em alta temperatura (34/28 °C – dia/noite); e de 1' a 5', cultivado em baixa temperatura (22/13 °C – dia/noite). Os números de 7 a 12 correspondem ao RNA total de plantas do genótipo CAC-1, cultivado em alta temperatura; e de 7' a 12', cultivado em baixa temperatura. Estádios de desenvolvimento da semente de soja, com base no peso fresco da semente: 1^o – 0 a 75 mg, 2^o – 76 a 150 mg, 3^o – 151 a 225 mg, 4^o – 226 a 300 mg, 5^o – 301 a 375 mg e 6^o – 376 a 450 mg. **B)**: análise eletroforética em gel desnaturante de agarose 1,2% do RNA total extraído de sementes da variedade CAC-1 e da linhagem CC4.

Na Figura 2b, apresentam-se os RNAs totais (controle) extraídos de 22 amostras de sementes de soja. Observou-se que os RNAs mostraram-se íntegros quando analisados por eletroforese em gel de agarose. Além disso, os valores confiáveis de absorvâncias a 260 nm (quantificação dos RNAs) devem ficar acima de 0,1, e a relação A_{260}/A_{280} ideal deve estar entre 1,8 e 2,0; no presente experimento, essa relação esteve entre 1,8 e 2,0, o que indica baixa contaminação por proteínas e, ou, fenol residuais, que podem inibir a transcrição reversa do RNA.

Com base na Figura 2a, foi observado que o decréscimo da temperatura não resultou em alteração no acúmulo de transcritos da colinafosfotransferase;

embora níveis significativamente mais elevados de ácidos graxos polinsaturados e alta atividade dessa enzima foram observados. Portanto, acredita-se que a estabilidade do mRNA correspondente à colinafosfotransferase seja baixa ou que a regulação desta não ocorra em nível transcricional.

Outra alternativa é que existe a possibilidade de hibridização cruzada com mRNAs de proteínas de mesma família (isoenzimas colinafosfotransferase (DEWEY et al., 1994)), podendo, portanto, ser a causa da não-diferenciação no acúmulo de transcritos detectada através da técnica de *Northern Blot*.

Resultados diversificados sobre indução, por baixa temperatura, de genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos têm sido encontrados: em *Arabidopsis*, a expressão do gene *fad 2*, que codifica para Δ^6 dessaturase microssomal, não é regulada por baixa temperatura (OKULEY et al., 1994), já a expressão do gene *fad 7*, para a Δ^3 dessaturase cloroplastidial, parece ser induzida por baixas temperaturas (GIBSON et al., 1994). Em tabaco transgênico, a expressão intensificada do gene que codifica para Δ^3 dessaturase cloroplastidial resultou em aumento nos níveis de ácidos graxos polinsaturados e, conseqüentemente, intensificou a tolerância ao frio dessas plantas (KODAMA et al., 1994). Em cianobactéria (*Synechocystis* sp. PCC 6803), o nível de mRNA para Δ^6 dessaturase aumentou com o decréscimo da temperatura ambiente (MURATA e WADA, 1995). Em soja, níveis elevados de ácidos graxos polinsaturados em sementes em desenvolvimento, crescidas em baixa temperatura, não foram devidos a uma expressão intensificada de gene da Δ^6 dessaturase (oleoil dessaturase) (HEPPARD et al., 1996), enzima responsável de incorporar dupla ligação na molécula de oleato ligada à fosfatidilcolina.

Diferentes mecanismos, induzidos por temperatura, podem estar envolvidos na regulação da composição de ácidos graxos em diferentes organismos. No caso da colinafosfotransferase de semente de soja, outros mecanismos de regulação, como a tradução ou modificação pós-traducional, podem ser responsáveis pelo aumento nos níveis de ácidos graxos polinsaturados, nominalmente ácidos linoléico (18:2) e linolênico (18:3).

Aumento nos níveis de ácidos graxos polinsaturados nos lipídeos de reserva da semente de soja, causado por temperaturas baixas, é

provavelmente o resultado das regulações traducional e pós-traducional, como alteração na atividade das dessaturases (CHEESBROUGH, 1989), da colinafosfotransferase e da lisofosfatidilcolina aciltransferase (YADAV, 1996), preferencialmente à regulação em nível transcricional.

Segundo DEWEY et al. (1994), o controle pós-transcricional pode também representar importante papel na regulação do gene que codifica para colinafosfotransferase.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho, constatou-se que o aumento na atividade da colinafosfotransferase em sementes produzidas sob baixas temperaturas não é, provavelmente, devido à regulação em nível transcricional. Conseqüentemente, a ativação da enzima pode ser regulada por fatores pós-transcricionais ou por mudanças conformacionais em suas moléculas.

Abordagens em direção a um entendimento mais completo da regulação gênica da síntese de ácidos graxos polinsaturados podem envolver, além das dessaturases, as enzimas colinafosfotransferase (CPT) e lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT), as quais apresentaram alta atividade em sementes de plantas crescidas sob baixa temperatura. Acredita-se, portanto, que mutações gênicas devem ser obtidas não somente para as dessaturases, mas também para as enzimas responsáveis pelo enriquecimento do conteúdo de ácidos graxos polinsaturados na fração óleo, nominalmente colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase.

Modificações na composição de ácidos graxos nas sementes de culturas oleaginosas, por meio de mutação ou expressão anti-senso, de enzimas-chave na biossíntese de ácidos graxos podem resultar em linhagens com "performance" inaceitável para produção. Por exemplo, alterações no(s) gene(s) que codifica(m) para colinafosfotransferase podem ser cruciais para a sobrevivência da planta de soja, uma vez que esta enzima é responsável não só por disponibilizar ácidos graxos polinsaturados para produção do óleo, como

também por produzir lipídeos estruturais de membrana. No entanto, a lisofosfatidilcolina aciltransferase, apesar da escassez de informações sobre sua seqüência gênica e, ou, aminoacídica, pode, provavelmente, ser alvo de manipulação genética, uma vez que foi detectado alta atividade e essa enzima apresenta, aparentemente, a função exclusiva de enriquecer o *pool* de grupamentos acil-CoA com ácidos graxos insaturados para síntese de triacilgliceróis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, D. L.; MAROTO, F. G. Plants as “chemical factories” for the production of polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 481-497, 2000.
- ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Science – USA**, v. 74, p. 5350-5354, 1977.
- ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; PARDER, B. A.; REISER, J.; RENART, J.; STARK, G. R.; WAHL, G. M. Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper. **Methods in Enzymology**, v. 68, p. 220- 239, 1979.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, K. S. **Currents protocols in molecular biology in CD-ROM**. New York: John Wiley e Sons, Inc., 1998.
- BRUNER, A. C.; JUNG, S.; ABBOTT, A. G.; POWELL, G. L. The naturally occurring high oleate oil character in some peanut varieties results from reduced oleoyl-PC desaturase activity from mutation of aspartate 150 to asparagines. **Crop Science**, v. 41, p. 522-526, 2001.
- BYRUM, J. R.; KINNEY, A. R.; STECCA, K. L.; GRACE, D. J.; DIERS, B. W. Alteration of the omega-3 fatty acid desaturase gene is associated with reduced linolenic acid in the A5 soybean genotype. **Theor Appl Genet**, v. 94, p. 356-359, 1997.

- CHEESBROUGH, T. M. Changes in the enzymes for fatty acid synthesis and desaturation during acclimation of developing soybean seeds to altered growth temperature. **Plant Physiology**, v. 90, p. 760-764, 1989.
- DEWEY, R. E.; WILSON, R. F.; NOVITZKY, W. P.; GOODE, J. H. The AAPT1 gene of soybean complements a cholinephosphotransferase-deficient mutant of yeast. **Plant Cell**, v. 6, p. 1495-1507, 1994.
- FEHR, W. R.; WELKE, G. A.; HAMMOND, E. G.; DUVICK, D. N.; CIANZIO, S. R. Inheritance of reduced linolenic acid content in soybean genotypes A16 and A17. **Crop Science**, v. 32, p. 903-906, 1992.
- GIBSON, S.; ARONDEL, V.; IBA, K.; SOMERVILLE, C. Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast Δ^3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 106, p. 1615-1621, 1994.
- HEPPARD, E. P.; KINNEY, A. J.; STECCA, K. L.; MIAO, G. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal ω -6 desaturase genes in soybeans. **Plant Physiology**, v. 110, p. 311-319, 1996.
- KODAMA, H.; HAMADA, T.; HORIGUCHI, G.; NISHIMURA, M.; IBA, K. Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast Δ^3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. **Plant Physiology**, v. 105, p. 601-605, 1994.
- KINNEY, A. J. Genetic modification the storage lipids of plants. **Currents Opinion in Biotechnology**, v. 5, p. 144-151, 1994.
- KINNEY, A. J. Development of genetically engineered soybean oils for food applications. **Journal of Food Lipids**, v. 3, p. 273-292m, 1996.
- KNUTZON, D. S.; THOMPSON, G. A.; RADKE, S. E.; JOHNSON, W. B.; KNAUF, V. C.; KRIDL, J. C. Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene. **Proceedings of the National Academy Science USA**, v. 89, p. 2624-2628, 1992.
- LEMIEUX, B.; MIQUEL, M.; SOMERVILLE, C.; BROWSE, J. Mutants of *Arabidopsis* with alterations in seed lipid fatty acid composition. **Theor Appl Genet**, v. 80, p. 234-240, 1990.
- MIQUEL, M.; JAMES JR., D.; DONNER, H.; BROWSE, J. *Arabidopsis* require polyunsaturated lipids for low-temperature survival. **Proceedings of the National Academy Science USA**, v. 90, p. 6208-6212, 1993.
- MIQUEL, M. F.; BROWSE, J. A. High-oleate oilseeds fail to develop at low temperature. **Plant Physiology**, v. 106, p. 421-427, 1994.
- MURATA, N.; WADA, H. Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. **Biochemistry Journal**, v. 308, p. 1-8, 1995.

- OHLROGGE, J. B.; BROWSE, J.; SOMERVILLE, C. R. The genetics of plant lipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1082, p. 1-26, 1991.
- OKULEY, J.; LIGHTNER, J.; FELDMANN, K.; YADAV, N.; LARK, E.; BROWSE, J. *Arabidopsis* FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. **Plant Cell**, v. 6, p. 147-158, 1994.
- OSÓRIO, J.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, J.; MANCHA, M.; GARCÉS, R. Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acids in the oil. **Crop Science**, v. 35, p. 739-742, 1995.
- RAHMAN, S. M.; TAKAGI, Y.; KUBOTA, K.; MIYAMOTO, K.; KAWAKITA, T. High oleic acid mutant in soybean induced by X-ray irradiation. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 58, p. 1070-1072, 1994.
- RENNIE, B. D.; TANNER, J. W. New allele at the *Fan* locus in the soybean line A5. **Crop Science**, v. 31, p. 297-301, 1991.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Software: Primer3, 1998. Disponível em: http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primers3.htm
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SOKOLOV, B. P.; PROCKOP, D. J. A rapid and simple PCR-based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4009-4015, 1994.
- SOMERVILLE, C.; BROWSE, J. Plant Lipids: metabolism, mutants and membranes. **Science**, v. 252, p. 80-87, 1991.
- TONNET, M. L.; GREEN, A. G. Characterization of the seed and leaf lipids of high and low linolenic acid flax genotypes. **Archives Biochemistry Biophysics**, v. 252, p. 646-654, 1987.
- URIE, A. L. Inheritance of high oleic acid in sunflower. **Crop Science**, v. 25, p. 986-989, 1985.
- VOELKER, T. A.; WORELL, A. C.; ANDERSON, L.; BLEIBAUM, J.; FAN, C.; HAWKINS, D. J.; RADKE, S. E.; DAVIES, H.M. Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants. **Science**, v. 257, p. 72-74, 1992.
- YADAV, N. S. Genetic modification of soybean oil quality. In: VERMA, D. P. S.; SHOEMAKER, R. C. (Eds.). **Soybean genetics, molecular biology and biotechnology**. USA: CAB INTERNATIONAL, 1996. p. 127-188.
- WANG, X. M.; HILDEBRAND, D. F. Biosynthesis and regulation of linolenic acid higher plants. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 26, p. 77-792, 1988.

WANG, X. M.; NORMAN, H. A.; St JOHN, J. B.; YIN, T.; HILDEBRAND, D. F.
Comparasion of fatty acid composition in tissues of low linolenate mutants of
soybean. **Phytochemistry**, v. 28, p. 411-414, 1989.

WILCOX, J. R.; CAVINS, J. F. Registration of C1640 soybean germoplasm.
Crop Science, v. 26, p. 209-210, 1986.

CONCLUSÃO GERAL

A soja tem evoluído para ser uma das mais importantes culturas do mundo, e muito desse crescimento tem sido dirigido para a indústria de óleos comestíveis. Por isso, o controle genético da biossíntese dos ácidos graxos polinsaturados tem sido muito estudado, por meio da obtenção e caracterização de mutantes que apresentam diferentes composições desses ácidos.

Neste estudo, foi verificado aumento do teor de ácido linolênico no óleo de soja da variedade comercial CAC-1 e da linhagem mutante CC4 quando as plantas cresceram em baixa temperatura (22/13 °C – dia/noite), porém a variação foi menor na linhagem mutante. Adicionalmente, esse teor elevado de ácido linolênico pode ser devido ao aumento das atividades da colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase, as quais apresentaram alta atividade em sementes crescidas em baixa temperatura.

Em ambos os genótipos, as enzimas tiveram comportamento similar, evidenciando que a mutação na linhagem CC4 não ocorreu em nenhum dos genes que codificam para colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase.

Apesar de estudos extensivos recaírem sobre as dessaturases, as quais introduzem duplas ligações nas moléculas de ácidos graxos saturados, sugere-se um estudo mais intensivo e detalhado sobre a enzima lisofosfatidilcolina aciltransferase, como: purificação, cinética enzimática e padrão de expressão

do gene que a codifica, uma vez que essa enzima apresentou pico de atividade à temperatura de 15 °C e sua função parece ser exclusivamente de enriquecer o *pool* de acil-CoA com ácidos graxos polinsaturados. A manipulação genética dessa enzima poderia ser um caminho viável para produção de linhagens com um conteúdo menor e mais estável de ácidos graxos polinsaturados nos lipídeos de reserva.

Adicionalmente, acredita-se que o aumento da atividade das enzimas colinafosfotransferase e lisofosfatidilcolina aciltransferase seja um provável mecanismo de tolerância ao frio utilizado pelas plantas de soja, uma vez que ambas as enzimas possuem a função de disponibilizar ácidos graxos polinsaturados, essenciais para manter maior fluidez das membranas biológicas e dos lipídeos de reserva.