

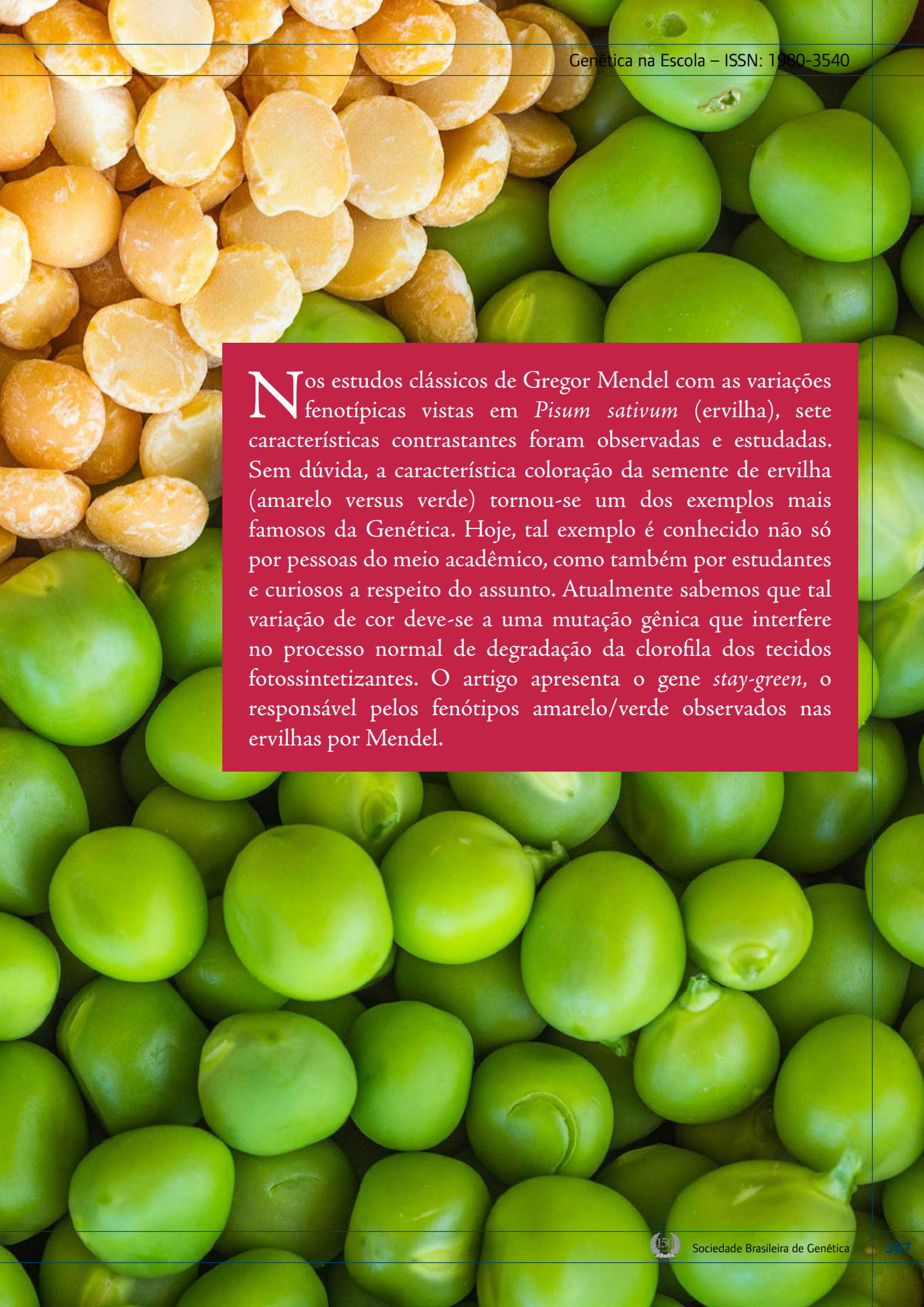
O gene *Stay-Green* e a cor das sementes de Mendel

Bruno Henrique Garcia¹ e Tiago Campos Pereira^{1,2}

¹ Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

² Programa de Pós-Graduação em Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Autor para correspondência: tiagocampospereira@ffclrp.usp.br



Nos estudos clássicos de Gregor Mendel com as variações fenotípicas vistas em *Pisum sativum* (ervilha), sete características contrastantes foram observadas e estudadas. Sem dúvida, a característica coloração da semente de ervilha (amarelo versus verde) tornou-se um dos exemplos mais famosos da Genética. Hoje, tal exemplo é conhecido não só por pessoas do meio acadêmico, como também por estudantes e curiosos a respeito do assunto. Atualmente sabemos que tal variação de cor deve-se a uma mutação gênica que interfere no processo normal de degradação da clorofila dos tecidos fotossintetizantes. O artigo apresenta o gene *stay-green*, o responsável pelos fenótipos amarelo/verde observados nas ervilhas por Mendel.

A FOTOSSÍNTESE E OS TIPOS DE CLOROFILA

A vida na Terra é dependente da energia proveniente do Sol, que é convertida em energia química através de uma complexa série de reações denominadas, conjuntamente, de fotossíntese. De maneira muito simplificada este processo pode ser representado pela equação $6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + \text{luz} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$. A luz que faz parte desta reação corresponde a fótons que viajaram 150 milhões de quilômetros do Sol até a superfície terrestre e que são utilizados para a síntese de carboidratos – moléculas orgânicas que atuam, em última análise, como “reserva bioquímica da energia solar”, que serão utilizados como fontes energéticas para os inúmeros processos celulares.

A fotossíntese ocorre nos tecidos verdes das plantas (caules verdes, frutos verdes e principalmente folhas). Os tecidos fotossin-

teizantes são verdes porque as moléculas de clorofila absorvem grande parte do espectro luminoso visível (convertendo-o em energia química) e refletem em especial a luz verde, que é captada por nossos olhos. Estes tecidos são ricos em cloroplastos, organelas celulares nos quais estão localizados os fotossistemas (figura 1), por sua vez constituídos pelos: (i) Complexo Coletor de Luz (LHC) e (ii) Complexo do Centro de Reação (CCR). Alguns dos elementos centrais destes fotossistemas são os pigmentos associados à fotossíntese: clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) e os **carotenoides**.

As clorofilas *a* e *b* são quimicamente muito semelhantes entre si. A clorofila *a* é o pigmento-chave na captação dos fótons e está presente nos dois complexos (CCR e LHC), ao passo que a clorofila *b* tem um papel acessório e está localizada no LHC. Os carotenoides parecem atuar principalmente na fotoproteção, absorvendo e dissipando o excesso de energia luminosa.

Carotenoide – uma classe ubíqua de moléculas nos organismos vivos e relacionada ao caroteno. Trata-se de um pigmento de coloração amarelada ou alaranjada que atua em diversos aspectos celulares, tais como: fotossíntese, proteção contra o estresse oxidativo e modulação da microviscosidade de membranas.

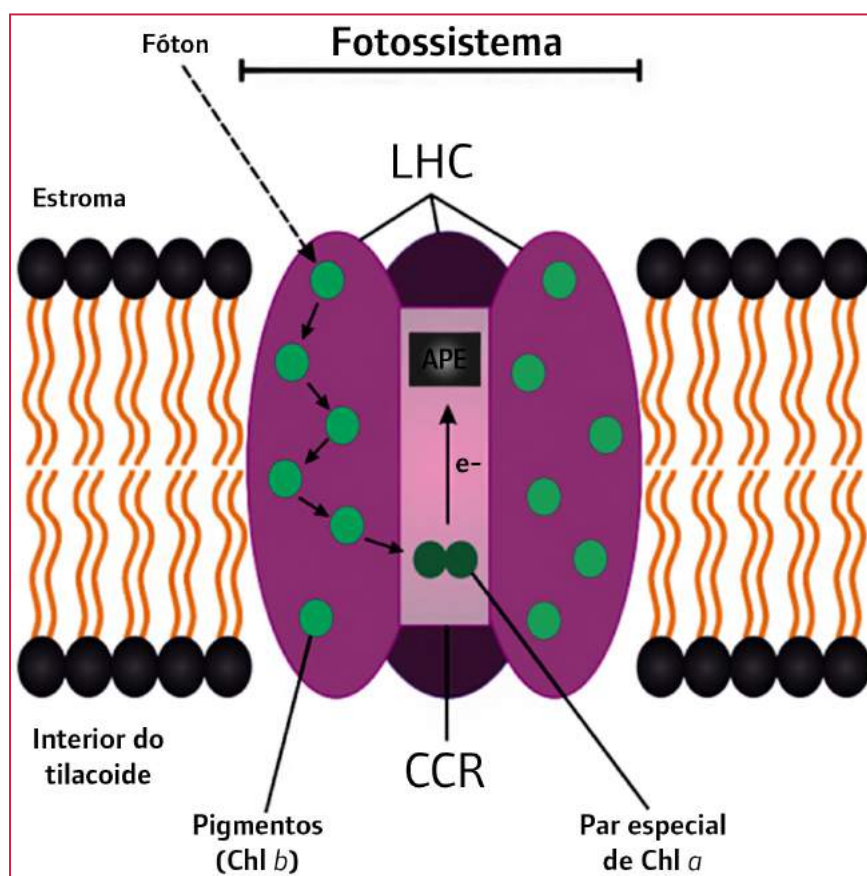


Figura 1.

A estrutura do fotossistema. A fotossíntese é uma complexa série de reações que convertem energia luminosa em energia química dentro do cloroplasto. Algumas destas etapas ocorrem nos fotossistemas, localizados nas membranas dos tilacóides; outras etapas ocorrem no estroma (fluido entre os tilacóides). A imagem representa um fotossistema e seus componentes: o Complexo Coletor de Luz (LHC) e o Complexo do Centro de Reação (CCR). Os fótons incidem sobre pigmentos do LHC (como a clorofila *b*), sendo esta energia sequencialmente transmitida até alcançar um par especial de clorofilas *a* localizado no CCR. A energia do fóton promove a transferência do elétron (e-) da clorofila *a* (Chl *a*) do CCR para o aceptor primário de elétrons (APE). Adaptado de REECE *et al.*, 2015.

A VIA DE DEGRADAÇÃO DA CLOROFILA *a* EM FOLHAS SENESCENTES

Durante o período de senescência normal dos tecidos fotossintetizantes da ervilha, a clorofila *b* é degradada, resultando na clorofila *a*, em um processo que ocorre em três etapas (figura 2): (i) hidrólise da Chl *a* em clorofilida e fitol pela ação da clorofilase; (ii) remoção de Mg^{2+} da clorofilida, catalisada pela Mg-dequelatase, produzindo feoforbídeo e (iii) clivagem do feoforbídeo por meio da feoforbídeo *a*-oxigenase. No terceiro passo, quando de fato a cor verde é perdida, o feoforbídeo é convertido em um catabólito incolor. A partir de então, o tecido passa a apresentar-se com uma coloração “de fundo”, geralmente amarela. A deficiência enzimática em qualquer uma das três etapas descritas anteriormente pode resultar em um fenótipo verde.

NYC1 é a enzima responsável por metabolizar a clorofila *b* em clorofila *a*.

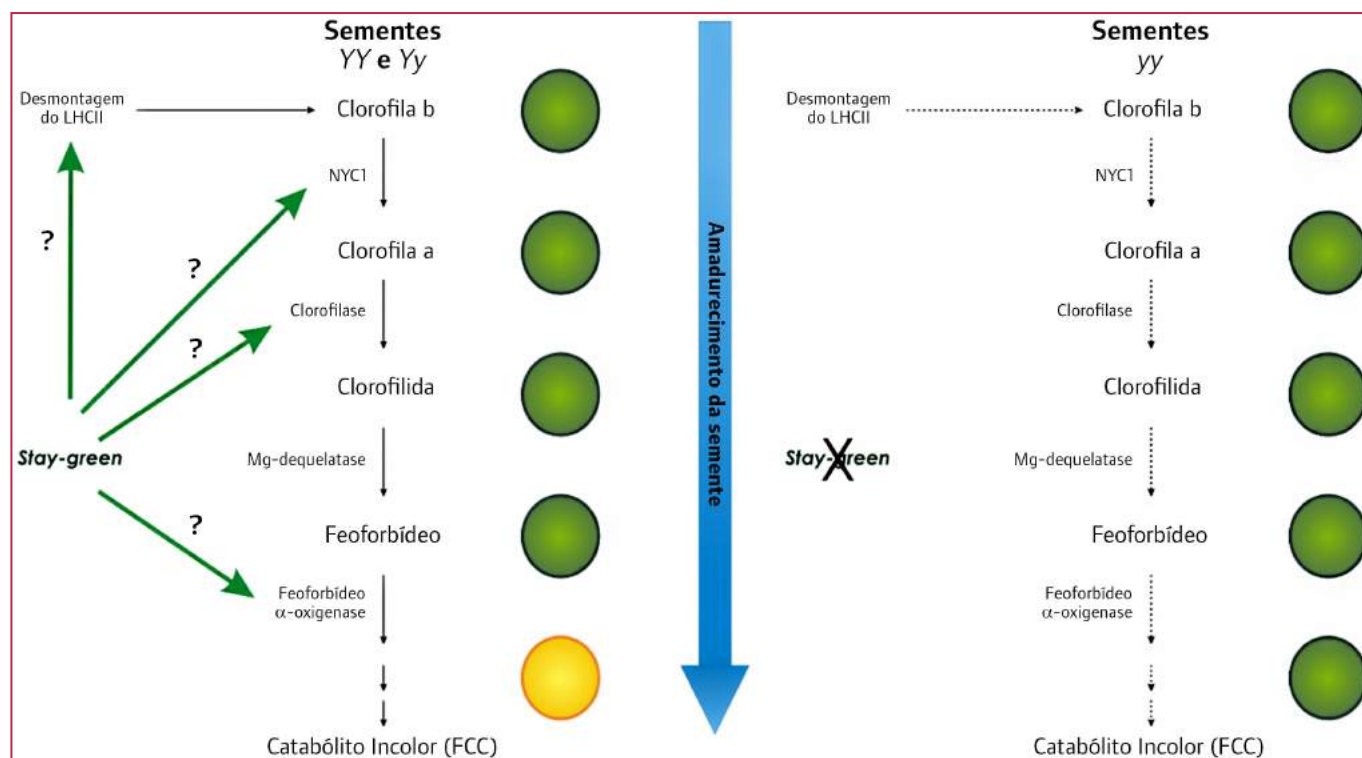
Enzima PaO, feoforbídeo *a*-oxigenase, converte feoforbídeo no produto seguinte da via metabólica de produção de um catabólito incolor, o FCC.

OS MUTANTES “STAY-GREEN”

Os mutantes que retêm a coloração verde durante a senescência são conhecidos como *stay-green* (do inglês, “permanecem verdes”). Diversos genes regulam o processo de senescência foliar como, por exemplo, os genes envolvidos na regulação hormonal. Por isso, falhas na produção de hormônios podem gerar um mutante “*stay-green*”. Outra forma de gerar este fenótipo é por meio de mutações em genes da via de degradação da clorofila.

Neste contexto, destaca-se o gene *SGR* (*stay-green*), que tem um papel fundamental no catabolismo da clorofila. Apesar de ser um importante agente neste processo, seu exato papel ainda é incerto. Alguns pesquisadores propõem que *SGR* regule (pós-)traducionalmente as proteínas de degradação de clorofila, como a **NYC1**, a **enzima PaO** e, possivelmente, também a clorofilase (figura 2) (SATO *et al.*, 2007).





Esta regulação mediada por SGR poderia ocorrer em diversos níveis: na síntese proteica (de NYC1, PaO e/ou clorofilase), na estabilidade destas proteínas, em suas atividades enzimáticas e/ou na acessibilidade aos pigmentos (Figura 2).

Outros pesquisadores sugerem que a proteína SGR poderia atuar facilitando a desmontagem do Complexo Coletor de Luz II (LHCII) (figura 1), liberando a clorofila *b* para a entrada na via de degradação da clorofila *a* (AUBRY *et al.*, 2008).

Figura 2.

A relação do gene *stay-green* com a cor da semente. A via de catabolismo das clorofilas *a* e *b* envolve uma série de passos, mediados por diversas enzimas (NYC1, clorofilase, Mg-dequelatase, feoforbídeo α -oxigenase etc). O gene *stay-green* codifica uma proteína que, de alguma forma, favorece a degradação dos pigmentos de clorofila. Alguns pesquisadores acreditam que ele regule positivamente as enzimas desta via; outros sugerem que ela auxilie na desmontagem do Complexo Coletor de Luz (LHCII - *light harvesting complex II*), permitindo assim que a clorofila *b* entre na via de degradação. Em sementes *yy* a proteína SGR não é funcional, de tal forma que o processo de catabolismo do pigmento não ocorre, levando assim à manutenção da coloração verde.



Fator é a unidade hereditária proposta por Mendel. De acordo com ele, um indivíduo apresentaria dois fatores para cada uma de suas características (cor da semente, cor da flor, rugosidade da semente etc). Um dos fatores teria sido herdado do pai e, o outro, da mãe. Na nomenclatura moderna, os fatores de Mendel correspondem aos alelos.

O GENE *SGR*

Segundo Mendel, havia um par de **fatores** responsável pela característica da cor do cotilédone e ele deduziu, pelos resultados de seus experimentos, que a cor amarela era dominante. Em 2007, Armstead e colaboradores demonstraram que este fator corresponde ao gene *SGR* em ervilhas. O mutante deste gene retém não apenas a coloração verde no cotilédone durante o amadurecimento do fruto, como também as folhas permanecem verdes durante a senescência. A mutação é recessiva, portanto, plantas com o alelo mutante em homozigose são *stay-green*, enquanto as plantas heterozigóticas exibem o fenótipo amarelo.

O gene *SGR* localiza-se no braço longo do cromossomo 9 e é formado por quatro éxons e três íntrons. O segmento de DNA que corresponde ao gene apresenta cerca de 2.000 pares de bases e codifica uma proteína de 263 aminoácidos (número de acesso no GenBank: AM884278.1). Ao se comparar as sequências do gene *SGR* de planta selvagem com planta *stay-green*, algumas diferenças foram encontradas. A primeira delas (T12S) foi uma troca de aminoácidos na posição 12 da proteína: serina no lugar de treonina. A segunda diferença foi uma troca de aminoácido na posição 38 (N38K): ácido aspártico foi substituído por lisina. A terceira diferença correspondeu à inserção de dois aminoácidos (isoleucina e leucina) na posição 189 da proteína. Ao analisar qual dessas alterações seria a responsável pelo fenótipo “*stay-green*”, notou-se que as mutações T12S e N38K ocorrem em *peptídeos de trânsito* (sequência peptídica que serve para direcionar a proteína para alguma organela celular), enquanto a inserção de isoleucina e leucina na posição 189 ocorre em uma região relativamente conservada da proteína *SGR*. Quando a versão selvagem do gene *SGR* foi modificada pela inserção de 6 pares de bases correspondentes às trincas que codificam isoleucina e leucina na posição 189, observou-se o fenótipo *stay-green*, comprovando que referida inserção de bases leva à perda de função do gene (SATO *et al.*, 2007).

Conforme mencionado anteriormente, as plantas verdes possuem tanto clorofila *a* quanto *b*, sendo que ambos os tipos sofrem processo de degradação, regulado pela proteína *SGR* de alguma forma ainda não completamente esclarecida: ou a proteína *SGR* auxilia a desmontagem do LHCII, liberando a clorofila *b* para degradação, ou *SGR* regula positivamente as proteínas da via de catabolismo da clorofila *a* (vide a Figura 2).

PERSPECTIVAS E O GENE *SGR*

Os mutantes *stay-green* estão sendo usados atualmente para o estudo bioquímico da via de degradação da clorofila em plantas. O mapeamento e a clonagem do gene *stay-green* de diversas culturas agrícolas têm sido realizados com o objetivo prático de aumentar o potencial de produção dos cultivares. Plantas geneticamente modificadas para o gene *stay-green* manteriam o período fotossintético mesmo sob condições desfavoráveis de cultivo e seriam capazes de sustentar alta produtividade.

REFERÊNCIAS

- ARMSTEAD, I.; DONNISON, I.; AUBRY, S.; HARPER, J.; HÖRTENSTEINER, S.; JAMES, C.; MANI, J.; MOFFET, M.; OUGHAM, H.; ROBERTS, L.; THOMAS, A.; WEEDEN, N.; THOMAS, H.; KING, I. Cross-species identification of Mendel's I locus. *Science*, v.315, p. 73, 2007.
- AUBRY, S.; MANI, J.; HÖRTENSTEINER, S. Stay-green protein, defective in Mendel's green cotyledon mutant, acts independent and upstream of pheophorbide a oxygenase in the chlorophyll catabolic pathway. *Plant Mol Biol.* v.67, n.3, p. 243-56, 2008.
- REECE, J. B.; URRY, L. A.; CAIN, M. L.; WASSERMAN, S. A.; MINORSKY, P. V.; JACKSON, R.B. *Biologia de Campbell*. 10ª edição. Porto Alegre. Artmed, 2015.
- SATO, Y.; MORITA, R.; NISHIMURA, M.; YAMAGUCHI, H.; KUSABA, M. Mendel's green cotyledon gene encodes a positive regulator of the chlorophyll-degrading pathway. *PNAS*, v.104, p. 14169-14174, 2007.