



## EXPRESSÃO GÊNICA DURANTE A BIOSÍNTESE DOS ÁCIDOS GRAXOS EM SEMENTES DE *R. communis* L. E *J. curcas* L. 1

Aline da Costa Lima<sup>1</sup>, Gustavo Gilson Lacerda Costa, Kiara<sup>1</sup> Carolina Cardoso<sup>1</sup>, Muciana A. Cunha<sup>2</sup>, José Nicomedes Junior<sup>3</sup>, Gilberto Barbosa Domont<sup>4</sup>, Muciana A. Cunha<sup>2</sup>, Francisco de Assis Paiva Campos<sup>2</sup> e Márcio José da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, CBMEG, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil. [marciojs@unicamp.br](mailto:marciojs@unicamp.br); <sup>2</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, UFC; <sup>3</sup> PETROBRAS - CENPES, Rio de Janeiro; <sup>4</sup> Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro

**RESUMO** – Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas com foco na produção de biodiesel como combustível alternativo. Por isso, é de fundamental importância entender os mecanismos pelos quais as plantas oleaginosas sintetizam e acumulam o óleo (composto majoritariamente por ácidos graxos) no endosperma de suas sementes, visando este conhecimento para utilização em programas de melhoramento. Neste trabalho, apresentamos a montagem das vias de biossíntese de óleo para sementes em desenvolvimento de *R. communis* L. e de desenvolvimento e germinação de *J. curcas* L., a partir da construção de bibliotecas de ESTs. A partir destas vias, inferimos os diferentes níveis de expressão para cada gene nas diversas etapas das vias de biossíntese dos ácidos graxos em *R. communis* L. e *J. curcas* L.

**Palavras-chave** – *Jatropha curcas* L, *Ricinus communis* L, sementes, ácidos graxos, ESTs, expressão gênica.

### INTRODUÇÃO

Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas com foco na produção de biodiesel como combustível alternativo. Por isso, é de fundamental importância entender os mecanismos pelos quais as plantas oleaginosas sintetizam e acumulam o óleo (composto majoritariamente por ácidos graxos) no endosperma de suas sementes. Uma estratégia é analisar a expressão dos genes relacionados com as diferentes etapas da formação dos corpúsculos lipídicos, para um determinado tecido específico. Isto pode ser realizado através da construção *in Silico* das vias de biossíntese com os dados obtidos a partir de bibliotecas de ESTs construídas em diferentes fases do crescimento ou tecidos da planta.

1 Unicamp,UFC, BNB, Petrobrás e ANP. Projeto de P&D financiado pela Petrobras conforme Regulamento 5/2005 da ANP





Neste trabalho, apresentamos a montagem das vias de biossíntese de óleo para sementes em desenvolvimento de *R. communis* L. e de desenvolvimento e germinação de *J. curcas* L., a partir da construção de bibliotecas de ESTs. A partir destas vias, inferimos os diferentes níveis de expressão de cada gene nas diversas etapas da via biossíntese dos ácidos graxos e nas fases de desenvolvimento e germinação de *R. communis* L. e *J. curcas* L.

## METODOLOGIA

Os RNAs das sementes nos diferentes estágios foram extraídos utilizando Concert Plant RNA Reagent – Invitrogen. As bibliotecas de cDNA foram construídas utilizando-se a “BD SMART Technology” [1] e LD-PCR [2]. O seqüenciamento de DNA foi realizado utilizando o método Sanger [3]. Os cromatogramas foram lidos com o programa Phred [4] e o programa BD2006TRIMMER [5] foi utilizado para eliminar regiões com similaridade ao vetor, regiões de baixa qualidade e caudas poli-A. As sequências maiores que 100 pb foram mantidas para clusterização. Para identificação dos genes relacionados à biossíntese de ácidos graxos, os clusters foram submetidos ao KAAS (KEGG Automatic Annotation Server) [6]. Em seguida, separamos os clusters correspondentes à via metabólica de biossíntese de ácidos graxos (KEGG map00061) e identificamos o número de *reads* em cada um.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas vias do KEGG (map00061) foi possível identificar EST's codificantes para a maioria das enzimas envolvidas na biossíntese dos ácidos graxos de *R. communis* L. Particularmente, pode-se observar um aumento significativo do nível de expressão das enzimas envolvidas nas últimas etapas de síntese dos ácidos oléico e esteárico Além da biossíntese dos ácidos graxos comuns à maioria das plantas oleaginosas, *R. communis* L. também produz o ácido ricinoléico, que tem como seu precursor o ácido oléico [7]. A via de biossíntese de ácidos graxos no KEGG não descreve a formação do ácido ricinoléico, e por isso fizemos uma busca refinada no genoma de *R. communis* L. e em nossa biblioteca pelas enzimas presentes na via proposta para síntese deste ácido a partir do ácido oléico descrita em Bafor *et al*, [7]. Com estas análises encontramos as enzimas que são possíveis candidatas a catalisar as reações I a IV (Figura 2).

Com relação às vias de biossíntese de óleo de *J. curcas* L., seguimos os mesmos parâmetros do KEGG que utilizamos para a *R. communis* L. Nestes dados podemos perceber que as plantas





seguem o mesmo padrão de expressão dos genes relacionados com a biossíntese de óleo. Assim como *R. communis* L., *J. curcas* L. também apresenta o mesmo aumento da expressão dos genes na fase final da via de produção de óleo (Figura 3). Neste trabalho também construímos uma biblioteca de ESTs de sementes de *J. curcas* L. em germinação, realizamos uma análise adicional das vias de biossíntese de óleo desta biblioteca. A Figura 4 mostra o quanto na fase de germinação os genes relacionados com a biossíntese de óleo estão pouco expressos em relação à semente em desenvolvimento.

## CONCLUSÃO

A partir dos mapas de biossíntese propostos pelo KEGG, obtivemos o nível de expressão, em número de ESTs, para a maioria das enzimas envolvidas nas vias de biossíntese dos ácidos graxos em sementes de *J. curcas* L e *R. communis* L. Assim como esperado, foi observado um alto nível de expressão destas enzimas no estágio de desenvolvimento das sementes de ambas as oleaginosas, visto que é neste tecido e estágio que estas plantas acumulam óleo. Para *J. curcas* L, observamos que o nível de expressão dessas enzimas é menor durante o desenvolvimento das sementes é menor em relação ao desenvolvimento, pois este é um estágio dedicado especialmente ao acúmulo de óleo, enquanto na germinação esse óleo será utilizado como fonte de energia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baudet, C. and Z. Dias, New EST trimming strategy. *Advances in Bioinformatics and Computational Biology, Proceedings*, 2005. 3594: p. 206-209.
- Bafor, M., et al., Ricinoleic Acid Biosynthesis and Triacylglycerol Assembly in Microsomal Preparations from Developing Castor-Bean (*Ricinus-Communis*) Endosperm. *Biochemical Journal*, 1991. 280: p. 507-514.
- Barnes, W.M., PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(6): p. 2216-20.
- Ewing, B., et al., Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*, 1998. 8(3): p. 175-85.
- Moriya, Y., et al., KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(Web Server issue): p. W182-5.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. 74(12): p. 5463-7.
- Zhu, Y.Y., et al., Reverse transcriptase template switching: A SMART (TM) approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques*, 2001. 30(4): p. 892-897.



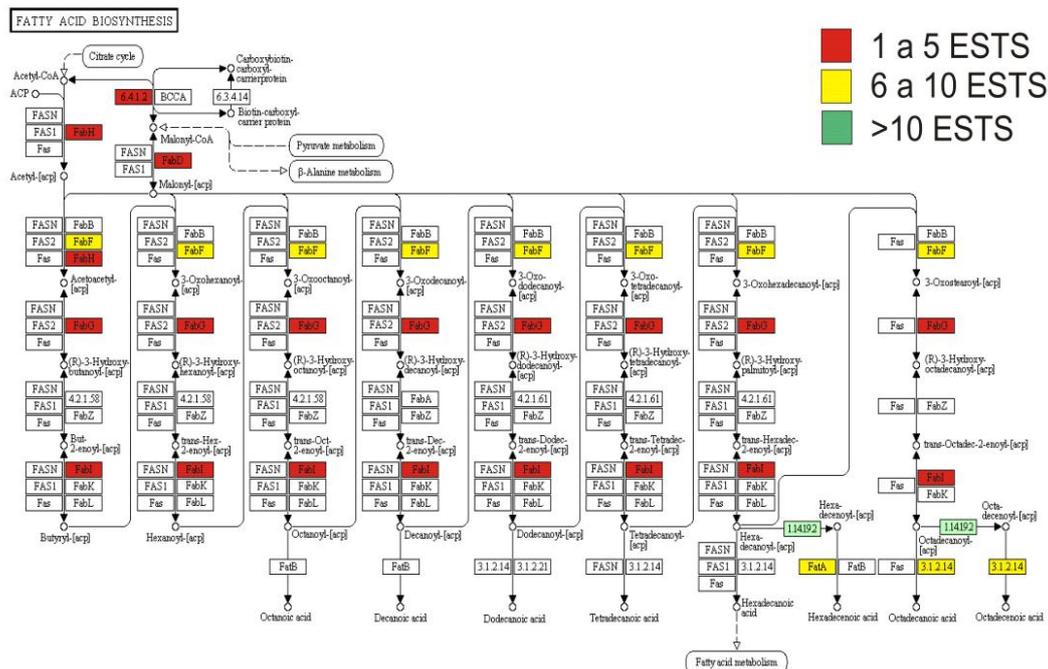


Figura 14 - Via de biossíntese de ácidos graxos em semente em desenvolvimento de *R. communis* L. Em destaque estão as enzimas para as quais encontramos pelo menos um transcrito na biblioteca. A cor está relacionada ao nível de expressão de cada enzima. Foi observado que, para algumas reações, a enzima correspondente não foi encontrada em nossos dados.

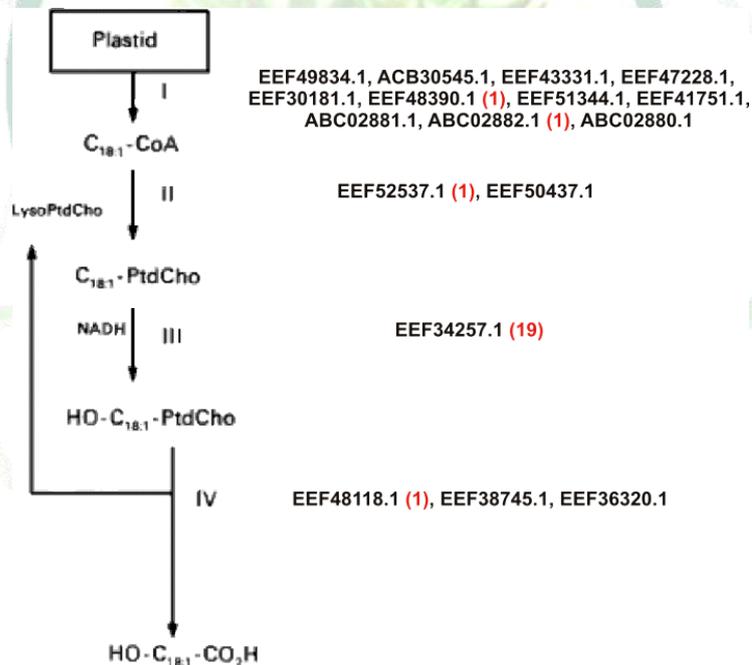


Figura 15 - Figura 2. Via proposta por Bafor et al. (1991) para síntese do ácido ricinoléico a partir do ácido oléico. Ao lado de cada reação, estão os GIs (identificadores do Genbank) para as possíveis enzimas que as catalisam. Em vermelho, está o número de ESTs identificados em nossa biblioteca correspondente a cada enzima.



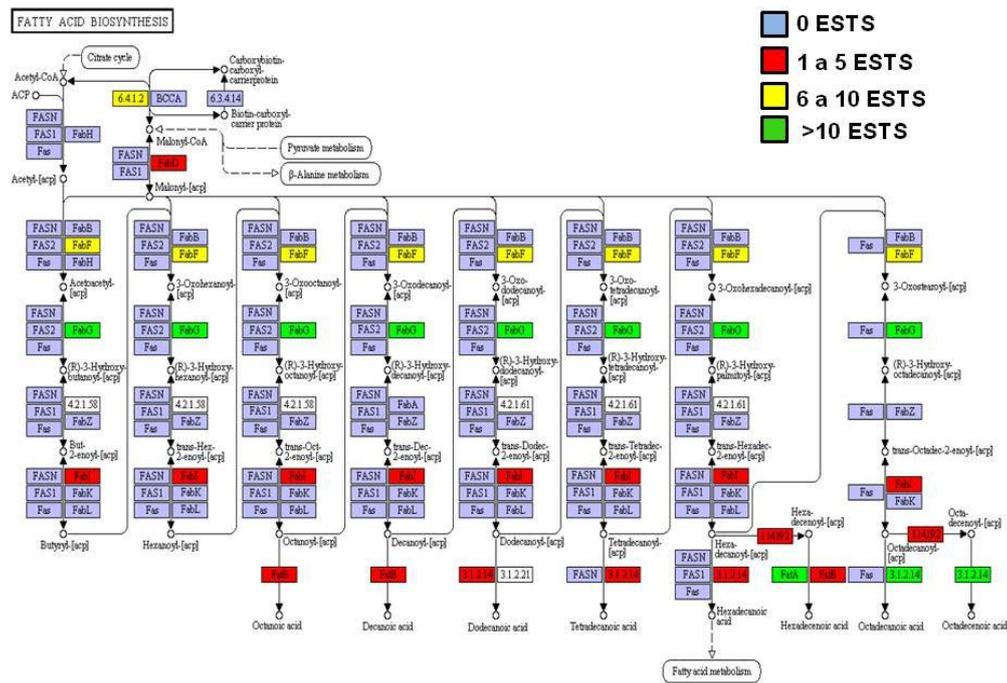


Figura 3 - Via de biossíntese de ácidos graxos em semente em desenvolvimento de *J. curcas* L. Em destaque estão as enzimas para as quais encontramos pelo menos um transcrito na biblioteca. A cor está relacionada ao nível de expressão de cada enzima. Foi observado que, para algumas reações, a enzima correspondente não foi encontrada em nossos dados.

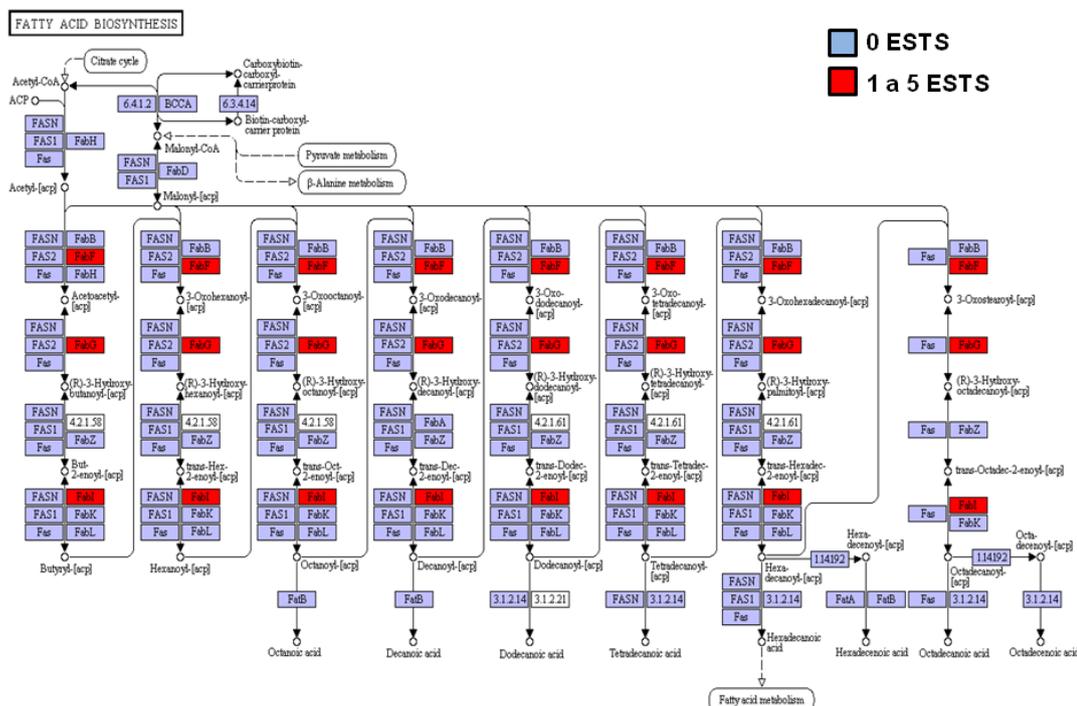


Figura 4 - Via de biossíntese de ácidos graxos em semente em germinação de *J. curcas* L. Em destaque estão as enzimas para as quais encontramos pelo menos um transcrito na biblioteca. A cor está relacionada ao nível de expressão de cada enzima. Foi observado que, para algumas reações, a enzima correspondente não foi encontrada em nossos dados.

