



# simpósio estadual de AGROENERGIA

IV reunião técnica de agroenergia - RS

## EXPRESSÃO DE DGAT2 AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE TUNGUE (*Vernicia fordii*).

Julieti Huch Buss<sup>1</sup>, Vanessa Galli<sup>2</sup>, Julia Labonde<sup>1</sup>, Rafael Messias<sup>3</sup>, Sérgio dos Anjos Silva<sup>3</sup>, Rogério Margis<sup>4</sup>.

### INTRODUÇÃO

Nos últimos anos vem crescendo a preocupação da sociedade em relação à escassez dos combustíveis fósseis, devido ao aumento desenfreado no consumo de energia. Sendo assim, a sociedade atual tem privilegiado energia limpa buscando então tecnologias que apresentem um menor impacto ao meio ambiente e que sejam sustentáveis, como o bioetanol e o biodiesel. Dentre as culturas estudadas para esse fim de pesquisa, o tungue (*Vernicia fordii*), nativo das Regiões Central e Oeste da China, tem despertado a atenção devido a algumas de suas características, dentre elas a adaptação à região de clima temperado, o alto teor de óleo na semente (entre 45-55% do peso da amêndoa) e o fato de ser uma cultura perene. O óleo de tungue apresenta alto teor de ácidos graxos conjugados, o que lhe confere capacidade secativa utilizada largamente na indústria, porém dificulta sua utilização como biocombustíveis (SHOCKEY et al., 2006). Assim, estudos relacionados à expressão de genes do metabolismo lipídico apresentam papel importante para compreensão da síntese destes ácidos graxos, visando sua redução.

Em relação à produção de óleos de armazenamento da semente, existem três eventos biossintéticos principais envolvidos. O primeiro envolve a síntese de ácidos graxos em plastídios, o segundo envolve a modificação destes ácidos graxos por enzimas localizados principalmente no retículo endoplasmático (RE), e o terceiro envolve a junção dos ácidos graxos nascentes em triacilgliceróis (TAG), que posteriormente irão acumular-se em vesículas que brotam do RE (CAGLIARI et al., 2010). Em diferentes espécies foi verificado que o gene que codifica para a enzima acil-CoA diacilglicerol aciltransferase (DGAT) desempenha importante papel no terceiro evento (TURCHETTO-ZOLET et al., 2011) e, portanto, o presente estudo objetivou analisar a

<sup>1</sup> Graduandas em Ciências Biológicas/UFPel. [jujuhuss@hotmail.com](mailto:jujuhuss@hotmail.com) e [julialabonde@hotmail.com](mailto:julialabonde@hotmail.com).

<sup>2</sup> Bióloga MSc. Doutoranda/(PPGBCM) - UFRGS. [vane.galli@yahoo.com.br](mailto:vane.galli@yahoo.com.br).

<sup>3</sup> Embrapa Clima Temperado. [rafaelmessias@hotmail.com](mailto:rafaelmessias@hotmail.com) e [sergio.anjos@cpact.embrapa.br](mailto:sergio.anjos@cpact.embrapa.br).

<sup>4</sup> PPGBCM – UFRGS. [rogerio.margis@gmail.com](mailto:rogerio.margis@gmail.com).

expressão da segunda cópia deste gene (DGTA2) em diferentes estágios de desenvolvimento da semente de tungue, visando avaliar seu papel na síntese de lipídeos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Cultivo de tungue e coleta dos frutos

Árvores de tungue foram cultivadas na Sede da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, tendo recebido igual tratamento durante seu desenvolvimento. Frutos de cinco estágios de desenvolvimento foram coletados, correspondendo a 20 dias após floração (DAF) (primeiro estágio), 35 DAF (segundo estágio), 50 DAF (terceiro estágio), 80 DAF (quarto estágio) e 100 DAF (quinto estágio). As sementes foram retiradas do fruto e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo mantidas a -80 °C até o momento das análises.

### 2.2 Avaliação da expressão do gene DGAT2

As amostras congeladas foram maceradas com auxílio de nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído a partir de 0,1g destas amostras maceradas utilizando metodologia baseada em CTAB com modificações (MESSIAS et al., 2010). A qualidade do RNA extraído foi avaliada através de eletroforese utilizando gel desnaturante de agarose 0,5%, enquanto que a concentração foi avaliada utilizando a técnica de fluorometria (QuBit-RNA BR, Invitrogen™). A partir de 500ng de RNA total, foi realizada a digestão com 1U de DNase e 1 × DNase I Reaction Buffer, e posteriormente a síntese de cDNA com a enzima MMLV, conforme indicações do fabricante (Invitrogen™). Os cDNAs foram amplificados por PCR em tempo real utilizando *primers* específicos para os genes DGAT2 e ACT (gene endógeno), construídos com o auxílio do programa Vector NTI10 (Invitrogen™) a partir de sequências de *Jatropha curcas* e *Ricinus communis* (ambas da família Euphorbiaceae) obtidas no banco NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), visto a limitação de sequências gênicas disponíveis de tungue. A eficiência destes *primers* foi previamente avaliada utilizando diluição seriada de cDNA (200ng a 5ng) e o *amplicon* gerado confirmado por sequenciamento utilizando o kit Dye Terminator DYEnamic ET Cycle Sequencing e o seqüenciador MegaBACE 1000 DNA (GE Healthcare). Para avaliação da expressão gênica, as seguintes condições da reação de PCR foram utilizadas: volume final de 20µL contendo 10ng cDNA, 10µL de Platinum Sybr green UDG (Invitrogen™) e 10pmol de cada *primer*. A amplificação foi realizada em um termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems) utilizando as seguintes condições: 50°C por 20s, 95°C por 10min, seguido por 45 ciclos de 15s à 95°C e 60s à 60°C. Condições da curva de dissociação: 15s à 95°C, 60s à 60°C, 30s à 95 °C e 15s à 60°C. O gráfico de expressão relativa foi gerado pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando verificar a expressão de DGAT2 em sementes de tungue, primeiramente o RNA total foi extraído de cinco estágios de desenvolvimento da semente. Através de eletroforese em gel desnaturante de agarose foi possível observar que o RNA extraído destas amostras apresentou proporção 28S:18S de aproximadamente 2:1, parâmetro este que indica que o RNA apresenta-se íntegro (BUSTIN et al., 2009). Diante do RNA extraído, a eficiência dos *primers* DGAT2 (Figura 1A) e ACT (Figura 1B) foi verificada utilizando diluições seriadas de cDNA, onde DGAT2 apresentou 101% e ACT apresentou 109% de eficiência, permitindo o uso em análises de expressão gênica.

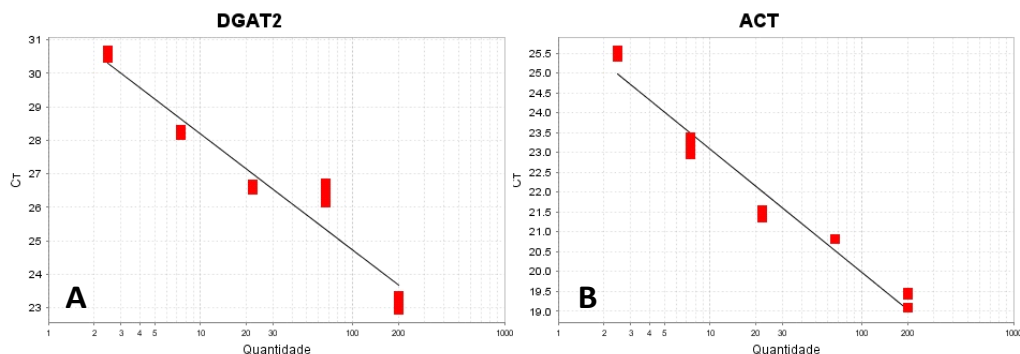


Figura 1. Eficiência dos primers correspondentes aos genes DGAT2 (A) e ACT (B) por PCR em tempo real.

Os triacilgliceróis (TAGs) são formados primariamente a partir de reações da enzima acil-CoA diacilglicerol aciltransferase (DGAT), considerada chave neste metabolismo por apresenta papel essencial no controle do fluxo quantitativo e qualitativo de ácidos graxos em TAGs de estoque. Duas formas enzimáticas de DGAT (DGAT1 e DGAT2) foram identificadas em uma grande variedade de eucariotos, fazendo parte de famílias gênicas distintas por se diferirem em nível de sequência protéica e de DNA, mas com redundância funcional (TURCHETTO-ZOLET et al., 2011). A análise utilizando PCR em tempo real permite observar que o gene DGAT2 aumenta sua expressão ao longo do desenvolvimento da semente em aproximadamente 95 vezes (Figura 2; note que o gráfico apresenta os dados em escala logarítmica de base 2).

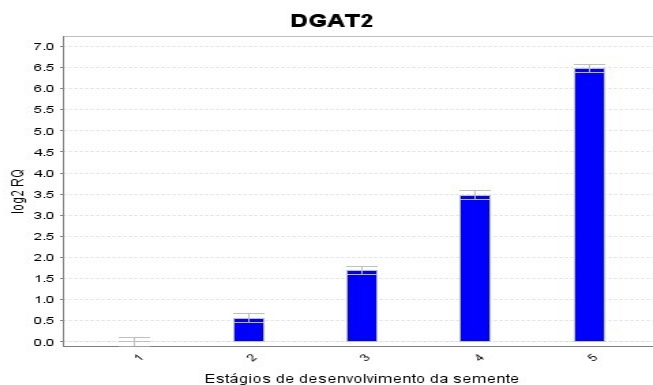


Figura 2. Expressão do gene DGAT2 por PCR em Tempo Real durante cinco estágios de desenvolvimento da semente de tungue.

Este resultado corrobora com resultados prévios encontrados na literatura que mostram que, para o amadurecimento ideal do fruto, é necessário que a semente apresente uma reserva de lipídios, visto que este acúmulo de óleo é importante reserva energética no momento da germinação (CAGLIARI et al., 2010). Além disso, é possível constatar que DGAT2 apresente função preferencial para a síntese de TGAs em relação ao gene DGTA1 que apresentou um aumento de 6,5 vezes nestas mesmas amostras (BUSS et al., 2012).

## CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos em PCR em tempo real constatou-se que os níveis de transcritos para o gene DGAT2 aumentam ao longo do desenvolvimento da semente, sugerindo que contribua de forma efetiva nos processos de amadurecimento e acúmulo de lipídios. Sugere-se novos estudos com outros genes do metabolismo lipídico para melhor compreensão de como ocorre a síntese nessa cultura tão pouco estudada.

## BIBLIOGRAFIA

BUSS, J.H.; GALLI, V.; LABONDE, J.; *et al.* Expressão de DGTA1 ao longo do desenvolvimento de sementes de tungue (*Vernicia fordii*). CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIÊNCIA, Pelotas, 2012.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, v.5, p. 611–622, 2009.

CAGLIARI, A.; PINHEIRO-MARGIS, M.; LOSS, G. *et al.* Identification and expression analysis of castor bean (*Ricinus communis*) genes encoding enzymes from the triacylglycerol biosynthesis pathway. *Plant Science*, v.179, p. 499–509, 2010.

MESSIAS, R. S.; GALLI, V.; SILVA, S. D. A. *et al.* Metodologias de extração e avaliação semi quantitativa da expressão de genes de metabolismo secundário do milho (*Zea mays* L.). *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento: Embrapa Clima Temperado*, n. 117, p. 1-25, 2010.

SHOCKEY, J. M.; GIDDA, S. K.; CHAPITAL, D. C. *et al.* Tung Tree DGAT1 and DGAT2 Have Nonredundant Functions in Triacylglycerol Biosynthesis and Are Localized to Different Subdomains of the Endoplasmic Reticulum. *The Plant Cell*, v. 18, p. 2294–2313, 2006.

TURCHETTO-ZOLET. A.C.; MARASCHIN, F. S.; MORAIS, G. L. *et al.* Evolutionary view of acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase (DGAT), a key enzyme in neutral lipid biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology*, p. 1471-2148, 2011.