

AVALIAÇÃO DA ALTERAÇÃO DE EXPRESSÃO DO GENE TROPINONA REDUTASE II (*tr2*), CHAVE NA ROTA DE CALISTEGINAS, EM LINHAGENS TRANSFORMADAS DE BATATA SILVESTRE (*Solanum commersonii* var. *malmeanum* Bitt.)

CIRO GUIDOTTI¹; GABRIEL DALMAZO²; FABIANA NORA²; MAURICIO SEIFERT²; LEONARDO NORA³

¹Universidade Federal de Pelotas – pedrociro23@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Pelotas – l.nora@me.com

1. INTRODUÇÃO

Calisteginas são nor-tropano alcalóides polihidroxiados derivados da rota dos tropano alcalóides. São sintetizadas, inicialmente, a partir da redução do substrato tropinona a tropina, catalizada pela enzima Tropinona Redutase II (TR2). Em espécies do gênero *Datura*, *Hyoscyamus*, *Duboisia* e *Scopolia*, TR2 compete pelo substrato com a enzima Tropinona Redutase I (TR1), a qual direciona a rota para a produção dos tropano alcalóides clássicos, Atropina e Escopolamina, que são amplamente utilizados para fins medicinais. As calisteginas apresentam atividade inibitória sobre uma série de enzimas glicosidases presentes em mamíferos e plantas, mais especificamente sobre β -glucosidase, α - e β -galactosidase, manosidase e β -xilosidase. Calisteginas são encontrados em uma variedade de espécies vegetais, destacando-se aquelas encontradas nas famílias Solanaceae e Convolvulaceae. A ocorrência simultânea desses compostos em espécies comestíveis (beringela, tomate, batata e repolho) e tóxicas (gênero *Ipomoea* sp.) (MOLYNEUX, 1995), produziu preocupação no meio científico quanto a segurança alimentar, considerando-se a presença desses compostos em alimentos consumidos em larga escala. Em estudos mais recentes, constatou-se mínima ou inexistente toxicidade das calisteginas quando administradas em experimentos envolvendo ratos (STEGELMEIER et al, 2008), alterando o foco científico para os possíveis efeitos benéficos desses compostos como tampões na absorção de carboidratos. Em estudo recente JOCKOVIĆ et al. (2013), constatou a efetividade de calisteginas na inibição da atividade de enzimas glicosidases responsáveis pela absorção de carboidratos no sistema digestivo humano. No entanto, o entendimento da função das calisteginas *in planta* foi pouco ou nada explorado. Enzimas glicosidases participam de uma série de processos fisiológicos, em batata podemos destacar o metabolismo do amido, no qual participam as enzimas Amido Sintase, Ramificadoras de Amido, Pululanase entre outras. O objetivo deste trabalho foi dar o primeiro passo no entendimento das funções das calisteginas no metabolismo da Batata silvestre *Solanum commersonii* var. *malmeanum* Bitt.. Plantas transformadas com a finalidade de silenciamento do gene *tr2*, e por consequência a teórica redução das concentrações de calisteginas, foram avaliadas quanto ao acúmulo de mRNA procedente da atividade do gene *tr2*. As avaliações foram realizadas através da técnica de PCR quantitativo (RT-qPCR).

2. METODOLOGIA

Tubérculos provenientes de linhagens transgênicas de batata selvagem (*Solanum commersonii* var. *malmeanum* Bitt.), obtidas em estudos anteriores (BARBOSA, 2009) foram utilizados nesse estudo. As linhagens transformantes contêm o vetor binário de transformação pBin19 fusionado com uma replicase viral do Vírus da Batata X (PVX), formando o cassete de expressão PVX-*gus-*astr2-nptII**, desenhado para suprimir a expressão do gene *tr2*. Os tubérculos foram brotados em BOD a 25°C ± 2°C, 70% ± 5% de umidade relativa e fotoperíodo de 16h. Plantas com 5 semanas (estólons de aprox. 6cm) foram amostradas. Para cada linhagem de planta (L2, L21, L42, L6 e L49) e controle (WT), três plantas foram selecionadas e tiveram as suas raízes amostradas (extremidade de raízes secundárias). Com a finalidade de redução do número de amostras total a serem analisadas, adotou-se a estratégia de *pool* de plantas, ou seja, para cada linhagem e controle, três plantas foram utilizadas para formar uma amostra biológica.

Após coletadas, as raízes (100mg) foram imediatamente transformadas em um pó fino com o auxílio de grau e pistilo na presença de nitrogênio líquido. A extração de RNA total foi realizada utilizando-se o kit comercial *RNAeasy Plant Mini Kit* (Qiagen®, Cat.: 74903). O DNA vestigial presente nas amostras foi removido utilizando-se a enzima *DNAse I recombinant, RNAase-free™* (Roche®, Cat.: 04 716 728 001). A integridade do RNA total extraído foi averiguada por corrida eletroforética das amostras em gel de agarose 1%.

A síntese de cDNA a partir do RNA total de *S. commersonii* foi realizada utilizando-se o kit *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen™, Cat. no: 18080-093) conforme instruções do fabricante com algumas modificações. A qualidade e quantidade do cDNA obtido foi mensurada com o uso de espectrômetro (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific™).

Oligonucleotídeos específicos foram desenhados usando-se o software *Perl Primer™* (MARSHALL, 2004) utilizando-se como base a sequência de *tr2* de *Solanum tuberosum* cv. Desire. Os genes normalizadores foram selecionados baseado-se em estudos de estabilidade de expressão realizados por NICOT et al (2005). Os oligonucleotídeos foram selecionados quanto a sua eficiência através da fórmula $E = -1 + 10^{[-1/\text{slope}]}$, sendo selecionados apenas aqueles que atingiram valores entre 90%-110%. A especificidade dos primers foi avaliada através de análises *in silico* e por curva de dissociação, apenas oligonucleotídeos que originaram picos únicos foram selecionados. A reação foi feita em termociclador *DNA Engine Opticon 2 Real-Time Cycler* (MJ Research) utilizando-se o reagente SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma Aldrich®, Cat. no. S4438). A reação de amplificação foi feita em um volume total de 20µL, contendo 1µL de cada oligonucleotídeo (5 µM); 10µL de *PCR Master Mix SYBR® Green*; 5 µL de cDNA (50ng) e 4µL de água ultrapura. As condições de reação foram as seguintes: desnaturação a 94°C por 2min, seguido de 40 ciclos de três etapas (95°C por 20s, 60°C por 30s e 72°C por 40s) seguido por uma curva de desnaturação partindo de 65°C até 95°C. A quantificação relativa foi feita pelo método descrito por LIVAK & SCHMITTGEN, (2005), onde o valor Cq (número de ciclos da reação de PCR necessários para atingir-se o limiar de detecção do termociclador) de cada amostra, é subtraído do valor médio de Cq dos dois genes normalizadores, obtendo-se o valor ΔCq. O valor ΔCq de cada amostra é então comparado com o valor ΔCq da linhagem controle (WT), originando o valor ΔΔCq. Os resultados foram graficamente apresentados como variação da indução ($\text{variação da indução} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1. Podemos observar as alterações no acúmulo de mRNA do gene *tr2* provocadas pelo evento de transformação nas diferentes linhagens de *S. commersonii*. Os resultados são expressos em variação de acúmulo de mRNA em relação ao controle. Cada linhagem foi comparada com o controle não transformado, que constitui a linha de base do gráfico. As linhagens L42, L21 e L2 sofreram decréscimos no acúmulo de *tr2* de respectivamente 3,12; 0,90 e 1,48 vezes em relação ao controle. A linhagem L6 não diferiu significativamente, enquanto as linhagens L57 e L49 tiveram acréscimos no acúmulo de *tr2* de 0,97 e 1,02 vezes em relação ao controle. Em nenhuma linhagem foi possível observar o completo silenciamento do gene, ou seja, a ausência total de mRNA de *tr2*.

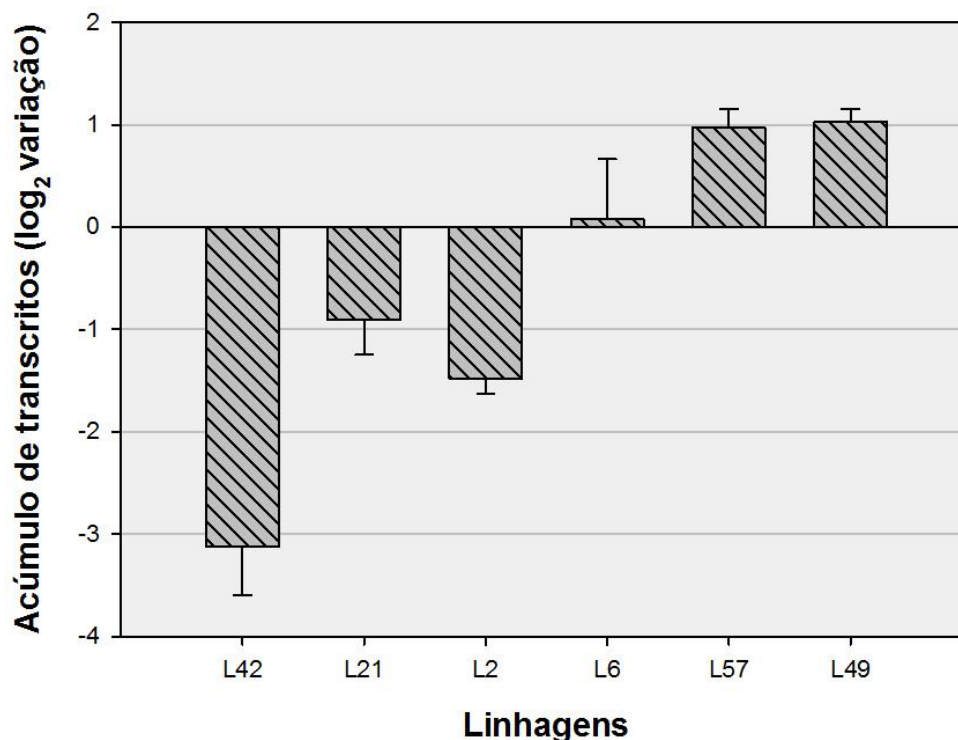


Figura 1. Variação no acúmulo de transcritos de *tr2* em linhagens independentes de *S. commersonii*.

É possível observar um gradiente de silenciamento entre as diferentes linhagens, com acúmulos variando entre valores limites e intermediários. Essa é uma característica das estratégias de silenciamento gênico envolvendo construções gênicas com a presença da replicase viral do PVX, em que não se observa a destruição total do mRNA alvo, mas sim gradientes de silenciamento (ANGEL E BAULCOMB, 1999).

4. CONCLUSÕES

Com os dados obtidos através desse estudo é possível a escolha de linhagens alvo para futuros trabalhos. A linhagem L42 se mostrou promissora como modelo para análises de acúmulos de calisteginas e suas possíveis implicações no conjunto de processos fisiológicos dependentes de enzimas glicosidases, tendo-se como foco principal as possíveis alterações nas características de amidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELL, S. M.; BAULCOMBE, D. C. Potato virus X amplicon-mediated silencing of nuclear genes. **The Plant Journal**, v. 20, n. 3, p. 357-362, 1999.

BARBOSA, L. M. P. **Supressão do gene tropinona redutase II e desenvolvimento de método para avaliar calisteginas em plantas de batata silvestre (*Solanum commersonii* subsp. *malmeanum* Bitt.)**. 2009. Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

JOCKOVIĆ, N., W. FISCHER, et al. Inhibition of Human Intestinal α -Glucosidases by Calystegines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.61, n.23, p.5550-5557, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MARSHALL, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics** v.20, n.15, p.2471-2472, 2004.

MOLYNEUX, R. J. et al. Identification of the Glycosidase Inhibitors Swainsonine and Calystegine B2 in Weir Vine (*Ipomoea* sp. Q6 {aff. *calobra*}) and Correlation with Toxicity. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 6, p. 878-886, 1995.

NICOT, N. et al. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 421, p. 2907-2914, 2005.

STEGELMEIER, B. L. et al. The Comparative Pathology of the Glycosidase Inhibitors Swainsonine, Castanospermine, and Calystegines A3, B2, and C1 in Mice. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 5, p. 651-659, 2008.