

## EXPRESSÃO GÊNICA DE FAD2 E FADX AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE TUNGUE (*Vernicia fordii*)

JULIETI HUCH BUSS<sup>1</sup>; VANESSA GALLI<sup>2</sup>; JOYCE MOURA BOROWSKI<sup>3</sup>; RAFAEL DA SILVA MESSIAS<sup>4</sup>; SÉRGIO DELMAR DOS ANJOS E SILVA<sup>5</sup>; ROGÉRIO MARGIS<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [julietibuss@hotmail.com](mailto:julietibuss@hotmail.com); <sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul/PPGBCM – [vane.galli@yahoo.com.br](mailto:vane.galli@yahoo.com.br); <sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [joyceborowski@gmail.com](mailto:joyceborowski@gmail.com); <sup>4</sup>Embrapa Clima Temperado – [rafael.embrapa@yahoo.com.br](mailto:rafael.embrapa@yahoo.com.br); <sup>5</sup>Embrapa Clima Temperado - [sergio.anjos@cpact.embrapa.br](mailto:sergio.anjos@cpact.embrapa.br); <sup>6</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul/PPGBCM – [rogerio.margis@gmail.com](mailto:rogerio.margis@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos uma das grandes preocupações da sociedade tem sido o aumento exacerbado no consumo de energia, o que tem resultado na rápida diminuição dos depósitos de combustíveis fósseis, assim como a alteração dos níveis de dióxido de carbono liberado na atmosfera. Sendo assim, a sociedade atual tem buscado 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*), da família *Euphorbiaceae* nativa das Regiões Central e Oeste da China, tem despertado o interesse tanto da comunidade científica quanto de produtores, devido algumas de suas características, as quais se destacam 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.

Além disso, por não se tratar de uma cultura comestível, não compromete a segurança alimentar, e seu cultivo em solos degradados pode auxiliar no controle da erosão, não competindo por áreas destinadas à produção de alimentos, levando em consideração ainda seu baixo custo de implantação e manutenção (SCHOCKEY et al., 2005).

O óleo extraído de suas sementes tem sido comumente utilizado em formulações de tintas, corantes, revestimentos, e resinas, devido à suas propriedades secativas, conferidas pelo alto teor de ácido eleostearico ( $18:3\Delta^{9cis,11trans,13trans}$ ), um ácido graxo conjugado não-usual. O mecanismo típico de biossíntese de ácidos graxos conjugados em plantas superiores inclui oxidação de ácidos graxos e rearranjo de insaturações. Por exemplo, o ácido linoleico ( $18:2\Delta^{9cis,12cis}$ ) pode ser modificado na posição  $\Delta^9$  para formar o ácido eleostearico. Várias enzimas envolvidas na produção de ácidos graxos conjugados tem sido identificadas. Estas enzimas, chamadas comumente de “conjugases” apresentam grande homologia em termos de suas sequencias de aminoácidos à família de enzimas  $\Delta^{12}$  oleato desnaturase (*FAD2*). A análise de sequências de ESTs de tungue permitiu identificar uma enzima similar à *FAD2*, a qual foi denominada *FADX*, que é capaz de converter ácido linoleico em ácido eleostearico (DYER et al., 2002). No entanto, o perfil de expressão destes genes (*FAD2* e *FADX*) ao longo do desenvolvimento da semente de tungue ainda não foi completamente elucidado.

Devido ao crescente interesse na cultura do tungue, o presente estudo objetivou-se analisar a expressão dos genes *FAD2* e *FADX* em diferentes estágios de desenvolvimento da semente de tungue, visando maior compreensão da síntese

e armazenamento de lipídeos, especialmente no que concerne à síntese elevada de ácido eleostearico na semente de tungue.

## 2. METODOLOGIA

### 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 em ultrafreezer a temperatura de -80 °C até o momento das análises.

### 2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

Todos os materiais foram previamente tratados com inibidor de RNase (RNase Away – Invitrogen™) para impedir a ação de RNases. As amostras congeladas foram maceradas com auxílio de nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído a partir de 0,1g destas amostras maceradas, segundo 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 (Invitrogen™), e posteriormente a síntese de cDNA com a enzima MMLV, conforme indicações do fabricante.

### 2.3 Avaliação da expressão dos genes *FAD2* e *FADX*

Após serem sintetizados, os cDNAs foram amplificados por PCR em tempo real, utilizando primers específicos para os genes. Estes primers foram construídos com o auxílio do programa Vector NT110 (Invitrogen™) a partir de sequências de *Vernicia fordii* provenientes de um banco de mRNAseq do nosso laboratório. 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 sequenciador MegaBACE 1000 DNA (GE Healthcare).

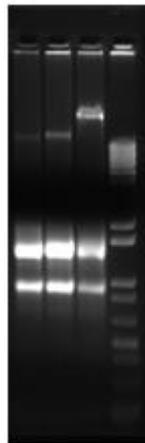
Para avaliação da expressão gênica, as seguintes condições da reação de PCR foram utilizadas: volume final de 20µL contendo 10ng de cDNA, 10µL de Platinum Sybr green UDG (Invitrogen™), e 10pmol de cada primer. A amplificação foi realizada em um termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems) utilizando 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  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existem três eventos biossintéticos principais envolvidos na produção de óleos de armazenamento da semente. O primeiro envolve a síntese de ácidos

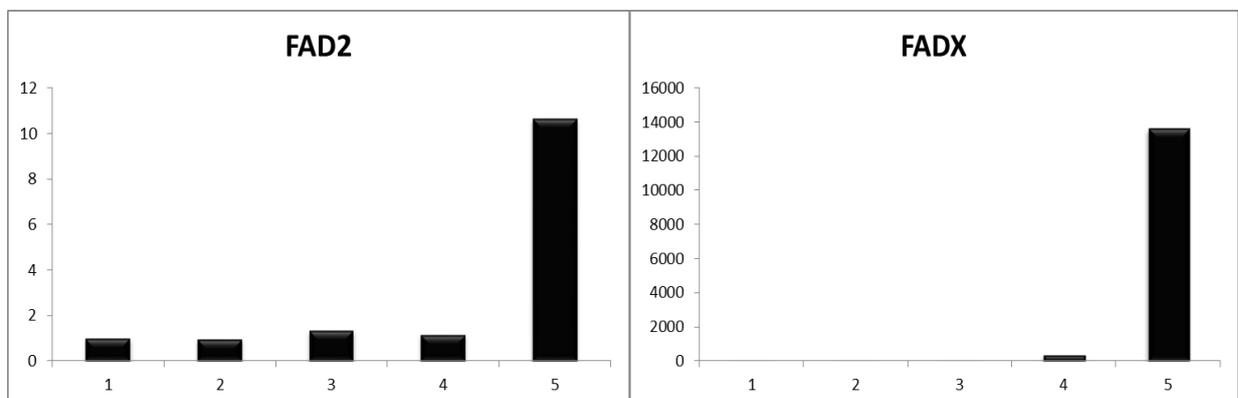
graxos em plastídios, o segundo envolve a modificação destes ácidos graxos por enzimas localizados principalmente no retículo endoplasmático (RE), e o terceiro envolve a junção dos ácidos graxos nascentes em triacilgliceróis (TAG) (CAGLIARI et al., 2010). A constituição de ácidos graxos nos TAGs, confere especificidade e seletividade no uso do óleo. Através de engenharia metabólica é possível modificar esta composição em ácidos graxos na semente de plantas oleaginosas a fim de obter um óleo com características ideais para uso como biodiesel ou para outros fins industriais. A fim de compreender os mecanismos moleculares envolvidos na síntese de ácido eleostearico, o óleo em maior abundância na semente de tungue, a expressão de *FAD2* e *FADX* foi verificada ao longo do desenvolvimento de sementes desta planta.

Primeiramente o RNA total foi extraído de cinco estágios de desenvolvimento da semente. Através de eletroforese em gel desnaturante de agarose, é possível observar que o RNA extraído destas amostras (Fig.1) apresenta proporção 28S:18S de aproximadamente 2:1, parâmetro este que indica que o RNA apresenta-se íntegro (BUSTIN et al., 2009).



**Figura 1** - RNA de três das amostras extraídas de sementes de tungue (cultivadas na Embrapa Clima Temperado), aplicado em gel desnaturante de agarose 0,5% e corado com gel red.

Diante do RNA extraído, a análise de expressão gênica foi avaliada por RT-qPCR, onde é possível observar (Fig.2) que a expressão dos genes *FAD2* e *FADX* aumentou ao longo do desenvolvimento da semente, sugerindo seu papel no acúmulo de óleo na semente, importante reserva energética no momento da germinação (CAGLIARI et al., 2010).



**Figura 2** - Expressão dos genes *FAD2* e *FADX* por PCR em Tempo Real dos cinco estágios de desenvolvimento da semente de tungue.

Este aumento foi mais pronunciado no gene *FADX*, sugerindo que no final do desenvolvimento da semente este gene seja ativado intensamente a fim de converter o ácido linoleico formado em ácido eleostearico. Os resultados mostram que estas desnaturases são candidatas potenciais para modificar por engenharia genética o conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados em sementes de tungue ou em sementes de outra espécie mais produtiva, a qual poderia servir de biorreator para produção de ácidos graxos de interesse para a indústria.

#### 4. CONCLUSÕES

Frente aos resultados obtidos em PCR em tempo real constatou-se que os níveis de transcritos para os genes *FAD2* e *FADX* aumentam ao longo do desenvolvimento da semente, sendo este aumento mais pronunciado no caso de *FADX*, sugerindo que estejam relacionados com o acúmulo de lipídeos na semente. Outros estudos serão necessários para verificar o papel específico destas enzimas no acúmulo de ácidos graxos conjugados.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. 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.; MASTROBERTI, A. A.; MARIATH, J. E. A.; MARGIS, R. 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.

DYER, J.M.; CHAPITAL, D.C.; KUAN, J.C.W.; MULLEN, R.T.; TURNER, C.; MCKEON, T.A.; PEPPERMAN, A.B. Molecular Analysis of a Bifunctional Fatty Acid Conjugase/Desaturase from Tung. Implications for the Evolution of Plant Fatty Acid Diversity. **Plant Physiology**, v.130, n.4, p.2027–2038, 2002.

MESSIAS, R. S.; GALLI, V.; SILVA, S. D. A.; SCHIRMER, M. A.; PILLON, C. N. 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**, Pelotas, n.117, p.1-25, 2010.

SHOCKEY, J. M.; DHANOA, P. K.; DUPUY, T.; CHAPITAL, D. C.; MULLEN, R. T.; DYER, J. M. Cloning, functional analysis, and subcellular localization of two isoforms of NADH:cytochrome b5 reductase from developing seeds of tung (*Vernicia fordii*). **Plant Science**, n.169, p.375–385, 2005.