

## **EXPRESSÃO DE DGAT1 AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE TUNGUE (*Vernicia fordii*)**

**BUSS, Julieti Huch<sup>1</sup>; GALLI, Vanessa<sup>2</sup>; LABONDE, Julia<sup>3</sup>; SILVA, Sérgio dos Anjos<sup>4</sup>; MARGIS, Rogério<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas/Ciências Biológicas- jujuhbuss@hotmail.com; <sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul/PPGBCM – vane.galli@yahoo.com.br; <sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas/Ciências Biológicas – julialabonde@hotmail.com; <sup>4</sup>Embrapa Clima Temperado - sergio.anjos@cpact.embrapa.br; <sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul/PPGBCM - rogerio.margis@gmail.com

### **1 INTRODUÇÃO**

O aumento no consumo de energia, resultando em rápida diminuição dos depósitos de combustíveis fósseis, bem como a alteração nos níveis de dióxido de carbono liberado na atmosfera tem sido uma grande preocupação nos últimos anos. Assim, a sociedade atual tem privilegiado 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 é nativa das Regiões Central e Oeste da China. O óleo extraído de suas sementes tem sido comumente utilizado em formulações de tintas, corantes, revestimentos, e resinas, devido à suas propriedades secativas. Atualmente, porém, tem despertado a atenção tanto da comunidade científica quanto de produtores, devido a 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 (SCHOKEY et al., 2005).

Os triacilgliceróis (TAGs) são formados primariamente a partir de reações da enzima acil-CoA diacilglicerol aciltransferase (DGAT), considerada chave neste metabolismo, representando um dos passos limitantes na formação de TAG durante o desenvolvimento da semente de oleaginosas. DGAT 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, porém apresentam redundância funcional (SCHOKEY et al., 2006; TURCHETTO-ZOLET et al., 2011).

Devido ao crescente interesse na cultura do tungue, no presente estudo objetivou-se analisar a expressão do gene DGTA1 em diferentes estágios de desenvolvimento da semente de tungue, visando avaliar seu papel na síntese de lipídeos.

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

## 2.2 Avaliação da expressão do gene DGAT1

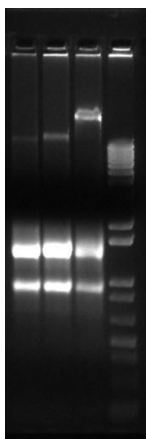
Todos os materiais foram previamente tratados com inibidor de RNase (RNase Away – Invitrogen™) para impedir a ação de RNases. As amostras congeladas foram maceradas com auxílio de nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído a partir de 0,1g destas amostras maceradas utilizando metodologia baseada em 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™). Após serem sintetizados, os cDNAs foram amplificados por PCR em tempo real, utilizando *primers* específicos para os genes que codificam para a enzima acil-CoA diacilglicerol aciltransferase (DGAT1), além do uso de um gene endógeno que codifica para a actina (ACT). Estes *primers* foram 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 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 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: 50C 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  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

## 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), que posteriormente irão acumular-se em vesículas que brotam do RE (CAGLIARI et al., 2010). Em diferentes espécies foi verificado que o gene DGAT desempenha importante papel neste processo (TURCHETTO-ZOLET et al., 2010) e por isso sua

expressão ao longo do desenvolvimento da semente foi avaliada no presente estudo.

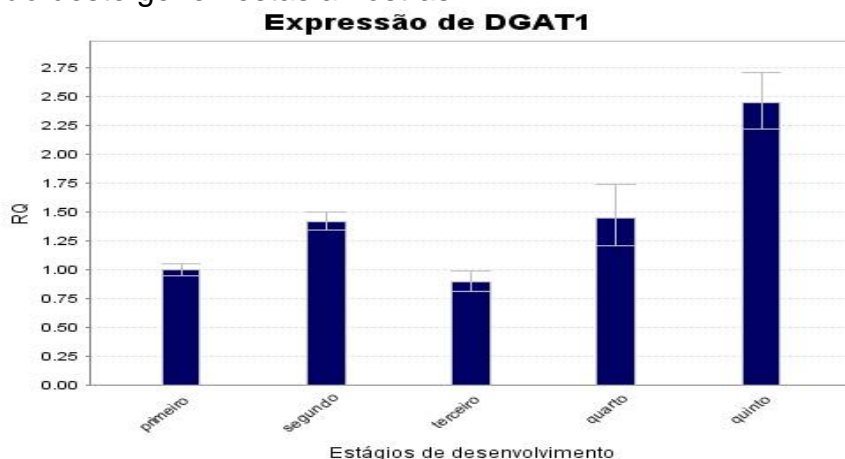
Primeiramente o RNA total foi extraído de cinco estágios de desenvolvimento da semente. Através de eletroforese em gel desnaturante de agarose, é possível observar que o RNA extraído destas amostras Fig.1 apresenta proporção 28S:18S de aproximadamente 2:1, parâmetro este que indica que o RNA apresenta-se 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 eficiência dos *primers* DGAT1 e ACT foi verificada utilizando diluições seriadas de cDNA, onde DGAT1 apresentou 101% e ACT apresentou 109% de eficiência, permitindo o uso em análises de expressão gênica.

A análise de expressão gênica mostrada na Fig.2 permite observar que a expressão do gene DGAT1 foi aumentando ao longo do desenvolvimento da semente. Isto 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). Porém, este aumento foi de apenas aproximadamente 2,5 vezes, sugerindo que a segunda cópia que codifica para a mesma enzima (DGAT2) apresente função preferencial para a síntese de TGAs. Porém, esta hipótese deve ser avaliada, verificando a expressão deste gene nestas amostras.



**Figura 2** - Expressão do gene DGAT1 por PCR em Tempo Real dos cinco estágios de desenvolvimento da semente de tungue.

#### 4 CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos em PCR em tempo real constatou-se que os níveis de transcritos para o gene DGAT1 aumentam ao longo do desenvolvimento da semente, sugerindo que contribua de forma efetiva nos processos de amadurecimento e acúmulo de lipídios.

#### 5 REFERÊNCIAS

- 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.; WITWER, 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.
- 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.
- SHOCKEY, J. M.; GIDDA, S. K.; CHAPITAL, D. C.; KUAN, J.; DHANOA, P. K.; BLAND, J. M.; ROTHSTEIN, S. J.; MULLEN, R. T.; DYER, J. M. 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.; CAGLIARI, A.; LOSS,G.; MARASCHIN, F.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. Aspectos evolutivos das diacilglicerol aciltransferases (DGAT): enzima chave na rota de síntese de lipídios neutros. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA**, 56. Guarujá, 14 a 17 de setembro de 2010.
- TURCHETTO-ZOLET. A.C.; MARASCHIN, F. S.; MORAIS, G. L.; CAGLIARI, C. M. B A.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. Evolutionary view of acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase (DGAT), a key enzyme in neutral lipid biosynthesis. **BMC Evolutionary Biology**, p. 1471-2148, 2011.