UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec

Curso de Graduação em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso

Caracterização e avaliação da expressão de miRNAs espécie-específicos durante o desenvolvimento de sementes de tungue (*Vernicia fordii*)

Pedro Lopes Reisser

Pelotas, 2018

Pedro Lopes Reisser

Caracterização e avaliação da expressão de miRNAs espécie-específicos durante o desenvolvimento de sementes de tungue (*Vernicia fordii*)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profª. Drª. Vanessa Galli

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R378c Reisser, Pedro Lopes

Caracterização e avaliação da expressão de mirnas espécie-específicos durante o desenvolvimento de sementes de tungue (Vernicia fordii) / Pedro Lopes Reisser ; Vanessa Galli, orientadora. — Pelotas, 2018.

53 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Expressão genética. 2. α-eleostearico. 3. Microrna. 4. óleo de tungue. I. Galli, Vanessa, orient. II. Título.

CDD : 634.97395

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Pedro Lopes Reisser

Caracterização e avaliação da expressão de miRNAs espécie-específicos durante o desenvolvimento de sementes de tungue (*Vernicia fordii*)

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 30 de novembro de 2018.

Banca examinadora:

Profª. Drª. Vanessa Galli (Orientadora)

Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi

Doutor em Biologia Molecular Vegetal pela Ecole Nationale Superieure Agronomique de Toulouse.

Drª. Isabel Lopes Vighi

Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas.

Mª. Rosane Crizel

Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico esse trabalho a meus pais, Mary e Mauro, por serem a maior parte do que sou.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, como também aos meus irmãos João e Eduardo, e a família como um todo pela presença, apoio nessa jornada e por serem a moral que me cerca.

Gostaria de deixar um apreço especial para a Luciana, por estar do meu lado nos momentos que eu mais precisei, me dando o suporte para seguir em frente.

Gostaria de agradecer a todos meus amigos pelo convívio e aos bons e maus momentos que passamos que me propuseram o crescimento.

Gostaria de deixar um apreço aos meus colegas de laboratório, pelo curto momento que vivemos mas de profunda importância nessa caminhada.

Por fim mas não menos importante, gostaria de agradecer a todos meus professores, com ênfase em meus orientadores, por me permitirem trilhar esse caminho e me ajudarem a conquistar minhas metas.

Muito obrigado a todos, por terem me ajudado a ser quem sou.

“O que se faz por amor sempre acontece além do bem e do mal.” §153, Além de bem e mal, **Friedrich Nietzsche**

“O que herdaste de teus pais, Adquire, para que o possua” Fausto v686-687, Primeira parte, **Johann Wolfgang von Goethe.**

Resumo

REISSER, Pedro Lopes **Caracterização e avaliação da expressão de miRNAs espécie-específicos durante o desenvolvimento de sementes de tungue (*Vernicia fordii*).** 2018. 53f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas .

Vernicia Fordii, uma arvore oleaginosa originada na china, conhecida como tungue, produz uma grande quantidade de óleo, com um alto teor do ácido graxo α-eleostearico, o qual é utilizado industrialmente para a produção de tintas, vernizes e da epoxy, devido a sua característica secante. Além disso, tem sido considerado promissora na produção de biodiesel. No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos no acúmulo de óleo e em outras características agronômicas de interesse nesta planta ainda são pouco conhecidos. No presente trabalho buscamos caracterizar e avaliar a expressão de miRNAs espécie-específicos de tungue, previamente identificados em bancos de mRNA-Seq. Para tal foram feitas analises de PCR em tempo real de 6 microRNAs ao longo do desenvolvimento da semente, além da predição da estrutura secundária de seus precursores a predição de seus possíveis alvos. Todos os miRNAs avaliados se mostraram presentes em altos nível de expressão no ultimo estádio de desenvolvimento da semente, estádio de maior acumulo de óleo. Seus alvos preditos incluem desde RNAs não codificantes a RNAs que codificam para proteínas envolvidas em diversas respostas biológicas. Esses resultados contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no acúmulo de óleo, além da resposta a estresses nesta cultura.

Palavras-chave: Expressão genética; α-eleostearico; microRNA; oléo de tungue

Abstract

REISSER, Pedro Lopes. **Caracterization and evaluetion of species-specific miRNAs expression during the development of tung seeds (*Vernicia fordii*).** 2018. 53s. Term paper (Bachelor of Biotechnology) - Technology Development Center, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018.

Vernicia Fordii, a Chinese oil-bearing tree known as tung, produces a large amount of oil, with a high content of α-eleostearic fatty acid, which is used industrially for the production of paints, varnishes and epoxy due to its secant characteristic. In addition, it has been considered promising in the production of biodiesel. However, the molecular mechanisms involved in oil accumulation and other agronomic characteristics of interest in this plant are still poorly understood. In the present work, we aimed to characterize and evaluate the expression of tung-species-specific miRNAs, previously identified in Seq mRNA banks. For this, real-time PCR analyzes of 6 microRNAs were carried out along the seed development, in addition to predicting the secondary structure of their precursors to predict their possible targets. All the miRNAs evaluated were present in high expression level in the last stage of development of the seed, the stage of greatest accumulation of oil. Its predicted targets include from non-coding RNAs to RNAs that encode proteins involved in diverse biological responses. These results contribute to a better understanding of the molecular mechanisms involved in the accumulation of oil, as well as the response to stress in this culture.

Keywords: Genetic expression; α-eleostearic; microRNA; tung oil

Lista de Figuras

Figura 1 - Ilustrações da planta de tungue.....17
Figura 2 - Estrutura química do ácido α-eleosteárico (α-ESA).....19
Figura 3 - Rota metabólica de síntese de lipídeos.. 23
Figura 4 - Ilustração da síntese e funcionamento de um miRNA.....26
Figura 5 - Esquematização do método *stem-loop*. 28
Figura 6 - Estrutura secundaria dos pré-miRNAs 36
Figura 7- Reformulação da estrutura secundária do Vfo_nMIR012.....37
Figura 8 - Expressão relativa dos miRNAs ao longo do desenvolvimento de sementes de tungue do genótipo 14RB. 45
Figura 9 - Expressão relativa dos miRNAs ao longo do desenvolvimento de sementes de tungue do genótipo 15RB 46

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Abundância (número de *reads*) de miRNAs em sementes maduras de tungue e sequência de *primers* para amplificação por PCR em tempo real.....34

Tabela 2 - pre-miRNAs e valores de MFE, AMFE e MFEI.....36

Tabela 3 - Alvos dos miRNAs selecionados 39

Tabela 4 - Quantificação e qualidade do RNA isolado de sementes de tungue de dois genótipos. 44

Sumário

1 Introdução geral 14

2 Objetivo geral 16

2.1 Objetivos específicos 16

3 Revisão Bibliográfica 17

3.1 Tungue 17

3.2 Síntese de lipídeos em plantas 20

3.3 Silenciamento gênico mediado por miRNAs 25

4 Material e Métodos 29

4.1 Seleção dos miRNAs espécie-específicos de maior abundância em sementes maduras de tungue 29

4.2 Predição da estrutura secundária dos precursores dos miRNAs (pré-miRNAs) selecionados 29

4.3 Determinação do gene-alvo dos miRNAs selecionados 30

4.4 Avaliação da expressão dos miRNAs selecionados por RT-qPCR 30

4.4.1 Amostras biológicas 30

4.4.2 Extração de RNA e transcrição reversa 30

4.4.3 Desenho dos primers 31

4.4.4 Amplificação do cDNA por PCR convencional 31

4.4.5 Avaliação da expressão dos miRNAs por qRT-PCR 32

5. Resultados e Discussão 33

5.1 Seleção dos miRNAs espécie-específicos de maior abundância em sementes maduras de tungue 33

5.2 Predição da estrutura secundária dos precursores dos miRNAs (pré-miRNAs) selecionados 34

5.4 Avaliação da expressão dos miRNAs selecionados por RT-qPCR ... 42

6 Conclusão 47

Referências 48

1 Introdução geral

No quarto semestre do curso de biotecnologia comecei a estagiar na Embrapa Clima Temperado, na Sede, no Laboratório de Biologia Molecular sob a orientação da Profª Drª Caroline Marques Castro, com o enfoque no melhoramento de *Solanum tuberosum*. Participando do Banco Ativo de Germoplasta da Batata, pude me aproximar da área vegetal, onde por seis meses fui Bolsista de Iniciação Cientifica pelo CNPq. No quinto semestre comecei a participar do grupo de pesquisa em genômica vegetal, orientado pelo Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi e pela Profª. Drª. Vanessa Galli recebendo novamente uma bolsa de iniciação cientifica do CNPq, para participar do projeto intitulado "Aspectos bioquímico-moleculares e tecnológicos de atributos de qualidade nutricional, sensorial e funcional em frutas e hortaliças". Nesse projeto pude trabalhar com o morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) em projeto que envolvia o papel do fitohormônio ácido abscísico, e da rota do ácido L-ascórbico. Então surgiu a possibilidade de trabalhar em um fruto diferente, onde seu foco não era a alimenta
sim a síntese de óleo e a possibilidade de usá-lo na produção de diesel, sempre
um afeição pela biologia molecular.

O tungue tem se mostrado uma árvore com um potencial interessante, uma vez que as sementes dos frutos produzem uma grande quantidades de óleo, sendo esse óleo predominantemente constituído por um ácido graxo com características próprias, o α-eleosteárico. Esse ácido graxo chega a representar 75-80% do óleo de tungue, e é comumente utilizado em vernizes e tintas pela característica de secagem rápida que proporciona. Ultimamente tem se estudado a utilização dele como fonte na produção de biodiesel; no entanto, por possuir três insaturações, usá-lo como única fonte acarreta em um alto índice de oxidação o que não é desejável. Porém, alguma porcentagem dele na composição do biodiesel pode contribuir com estabilidade em outras propriedades. Apesar do grande potencial do óleo de tungue, alguns problemas na cultura como o número de flores fêmeas, a produção desparelha, e a baixa variabilidade genética da espécie dificultam as técnicas de melhoramento convencional. Por isso se faz importante o conhecimento a respeito do genoma da espécie, e dos mecanismos bioquímicos e

moleculares envolvidos nas diversas respostas biológicas nesta planta. Nesse intuito o presente trabalho vem com a proposta de entender melhor um tipo especifico de regulação pós-transcricional mediado por miRNAs, validando e determinando o perfil transcricional destas moléculas e predizendo seus possíveis alvos.

2 Objetivo geral

Caracterizar e avaliar a expressão por PCR em tempo real de miRNAs espécie-específicos durante o desenvolvimento das sementes de dois genótipos de tungue, visando determinar miRNAs que apresentem papel durante esse processo.

2.1 Objetivos específicos

Selecionar os miRNAs espécie-específicos que apresentam maior número de leituras em banco de RNA-Seq proveniente de sementes maduras de tungue.

Predizer *in silico* a estrutura secundária das sequências precursoras dos miRNAs selecionados.

Determinar os genes-alvo prováveis dos miRNAs selecionados através de análises *in silico*.

Avaliar a expressão dos miRNAs selecionados por PCR em tempo real em amostras de sementes de dois genótipos de tungue em cinco estádios de desenvolvimento.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Tungue

Vernicia fordii, comumente chamada de tungue, é uma arvore perene subtropical pertencente à família Euphorbiaceae, originada e cultivada a milhares de anos na China (Figura 1A). Possui em média 12 m de altura, casca lisa, madeira macia, folhas verde-escuras de até 15 cm de largura em formato de coração e algumas vezes lobuladas (Figura 1D) Suas flores (Figura 1C) se apresentam na forma de cachos, esbranquiçadas e rosadas, produzidas no início da primavera, com reprodução monoica, possuindo flores masculinas e femininas na mesma inflorescência, geralmente com as flores pistiladas rodeadas por várias flores estaminadas. Os frutos de tungue (Figura 1B) são esféricos, no formato de pera, variando de cor verde a roxo escuro ao longo do seu amadurecimento, tendo em média 2,5 cm de largura e 1 cm de comprimento, e possuindo um invólucro duro, sendo que cada fruto contem de 3-7 sementes (comumente 5) (BLACKMON, 1945; BROWN e KELLER, 2005).

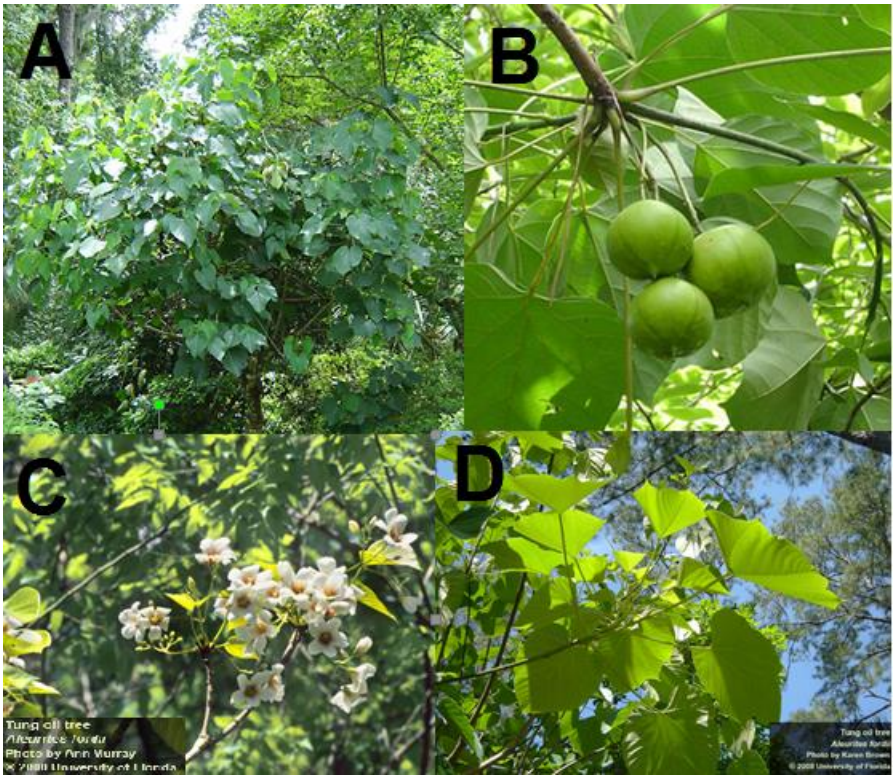

Figura 1 - Ilustrações da planta de tungue. A – árvore de tungue; B – frutos de tungue; C – inflorescência de tungue; D – folhas de tungue. Fonte: Karen e Ann Murray, UF/IFAS

Seu cultivo requer pelo menos 112 centímetros de precipitação distribuída ao longo do ano e 350 a 400 horas de inverno, com temperaturas de 7,2 °C ou menos. Variações muito bruscas de temperatura tendem a reduzir o crescimento das árvores e o tamanho dos frutos. Preferem solos em topos de morro ou encostas, bem drenados, com arejamento profundo e alta capacidade de retenção de umidade para o desenvolvimento facilitado de suas raízes (BLACKMON, 1945; BROWN e KELLER, 2005).

O óleo da semente de tungue é o foco da produção, por ser muito abundante no seu fruto (cerca de 50% do peso da amêndoa e 20% do peso do fruto), e por possuir alta qualidade secante, sendo assim utilizado em tintas, vernizes, linóleos, como agente de polimerização e em impressoras a tinta. Os chineses usavam o óleo para impermeabilização de alvenaria, tecido, sapatos, roupas e papel. O óleo, misturado com argamassa de cal ou queimado com o resíduo da amêndoa, foi um dos primeiros agentes do mundo para impermeabilização e calafetagem de barcos; recentemente vem sendo estudado como matéria prima para o biodiesel (BROWN e KELLER, 2005; PAN et al., 2013). A China permanece tendo pelo menos 70% do mercado de óleo de tungue; produz cerca de 418.294 toneladas, seguido pelo Paraguai com 35.980 toneladas, Argentina com 6.800 toneladas, Malawi com 4.100 toneladas, Madagascar com 2.600 toneladas, e Brasil com 264 toneladas de óleo, dados de 2013 (SHOCKEY et al., 2013).

Segundo dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, https://sidra.ibge.gov.br), o Rio Grande do Sul representa 100% da produção nacional. Em 2017 foram 225 toneladas de fruto seco, sendo os grandes produtores os municípios da serra gaúcha em Fagundes Varela, Coqueiro Baixo, Veranópolis e Cotiporã. A produção estimada para 2018 no Rio Grande do Sul, segundo Levantamento Sistemático da Produção Agrícola do IBGE, é de 314 toneladas de fruto seco, correspondendo a uma variação de 39,6% na safra.

Devido ao seu alto teor de óleo, e a características de resistência a estresses e cultivo pouco exigente quanto ao solo, alguns estudos recentes tem apontado o óleo de tungue como promissor em misturas de biodiesel, na finalidade de alterar seus aspectos

físicos e químicos (VANHERCKE et al., 2013). No entanto, o óleo de tungue apresenta um teor muito elevado (75-80%) do ácido α-eleoesteárico conjugado (C18: 3Δ9c, 11t, 13t) (α-ESA), um ácido graxo trienóico com ligações duplas conjugadas (CAHOON et al., 2006) (Figura 2). Além disso, apresenta cerca de 15% de ácido oleico, 4% de ácido palmítico e 1% de ácidos esteróis. Foram reportados também taninos, fito esteróis e uma saponina tóxica por List e Horhammer (1969–1979). Esse elevado teor de insaturações não é interessante para o uso como biodiesel. Isto porque as propriedades de um biodiesel são determinadas pela estrutura e composição dos seus ésteres graxos, os quais alteram a qualidade de ignição, o fluxo a frio, a estabilidade oxidativa, a viscosidade e a lubricidade do biodiesel. As ligações duplas interferem na viscosidade do biodiesel, sendo que as ligações *cis* tendem a ser menos viscosas que as ligações *trans*. Além disso, ácidos graxos saturados tendem a solidificar e cristalizar em baixa temperatura, causando problemas no sistema de injeção (IMAHARA et al., 2006). Um biodiesel com ácidos graxos insaturados apresenta baixo número de cetano, o que reflete em baixo potencial de ignição do biodiesel; assim, na prática, é necessário mais energia para causar a combustão (KNOTHE et al., 2003).

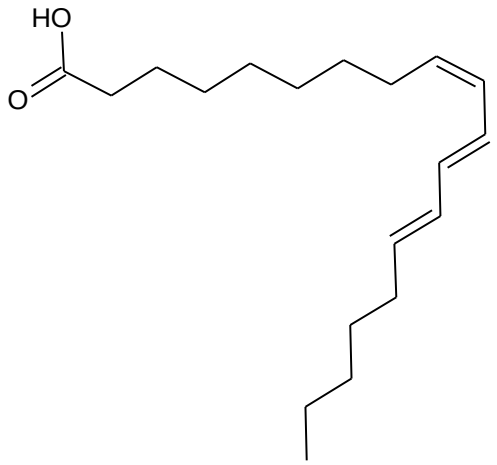

Figura 2 - Estrutura química do ácido α-eleosteárico (α-ESA).

Outro problema da utilização do óleo de tungue é o fato de esta planta não ter sido melhorada suficientemente, resultando em características agronômicas insatisfatórias para seu cultivo em larga escala. Um dos fatores que afetam a produtividade de tungue

é a presença de flores predominantemente masculinas (uma em cada 20 flores são femininas), o que acaba reduzindo a chance de polinização e, por consequência, o número de frutos (BROWN et al., 2005).

Assim, a identificação dos mecanismos envolvidos nos processos que afetam a produtividade de tungue e a composição de ácidos graxos no seu óleo é de extrema relevância, seja para sua utilização na produção de biodiesel ou na obtenção de ácido α-eleosteárico (α-ESA).

3.2 Síntese de lipídeos em plantas

Os lipídeos vegetais são sintetizados na forma de triacilgliceróis (TAG), os quais são ésteres composto por três ácidos graxos conectados a um glicerol. Os ácidos graxos de óleos vegetais podem variar em tamanho e no número de duplas ligações, afetando assim as características físico-químicas dos TAG e dos subprodutos, como o biodiesel. De modo geral, ácidos graxos saturados, perdem suas propriedades em baixas temperaturas, mas tem um alto teor de estabilidade oxidativa. No contrário, ácidos graxos insaturados, como é o caso do α-ESA, mantem suas propriedades em temperaturas mais baixas, mas possuem uma estabilidade oxidativa menor. Os ácidos graxos são moléculas com uma cadeia majoritariamente constituída de carbonos, são estruturas pequenas que conseguem armazenar uma boa quantidade de energia (~38 kJ/g). Para a geração dessa mesma quantidade de energia a partir de carboidratos ou proteínas, a célula teria de desprender o dobro do peso das moléculas (~16 kJ/g). As moléculas de ácidos graxos são a parte mais energética dos triacilgliceróis, detendo 95% do potencial energético da molécula total, apenas 5% advém do glicerol (NELSON e COX, 2017).

Os óleos vegetais são moléculas anfipáticas que se acumulam em micelas no citosol, chamados de oleossomos, no formato de TAGs. Essas estruturas tem como vantagem não aumentar a osmolaridade celular, no entanto sua síntese requer um desprovimento grande de energia celular. Suas funções vão de reserva energética até a constituição da parede celular, sendo que sua síntese ocorre nos plastídios (MURPHY, 2001).

A rota metabólica (Figura 3) dos ácidos graxos advém do acetil-Coenzima A (CoA), o qual é transformado em Malonil-CoA pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACCase). Em tungue, o gene que codifica para a forma homomérica de ACCase (HomoACC) apresenta maior expressão em estádios intermediários de desenvolvimento da semente, enquanto que o gene que codifica para uma das subunidades da forma hetoromérica (BCCP, biotin carboxyl carrier protein) é mais expresso nos estádios finais (GALLI et al., 2014b). O passo seguinte é a transferência de ACP (proteína carreadora de acil; do inglês, *acyl carrier protein*), realizada pela enzima malonil-CoA acil transferase (MAT), formando malonil-ACP. Esta molécula é então convertida a cetoacil-ACP, pela enzima KASIII (ceto-acil sintase III; do inglês, keto-acyl synthase III), cujo doador de carbonos é uma molécula de acetil-CoA. O cetoacil-ACP sofre seis adições consecutivas de carbono pela KASI, resultando na formação de um ácido graxo de 16 carbonos, ligado a ACP. A conversão desse ácido graxo (palmitoil-ACP) a um de 18 carbonos (estearoil-ACP) se deve à atuação da enzima KASII (OHLROGGE e JAWORSKI, 1997).

A geração de ácidos graxos insaturados ocorre da seguinte forma: o ácido graxo 18:00 estearoil-ACP é dessaturado para 18:01 oleoil-ACP por meio da ACP estearoil desaturase (SAD); enquanto que a segunda e terceira dessaturações para produzir 18:02 linoleico-ACP e 18:03 linolênico-ACP são realizadas por Δ12-dessaturase (FAD2) e ω3-dessaturase (FAD3), respectivamente (SHOCKEY et al., 2016). A expressão do gene que codifica para SAD é aumentada nos estádios intermediários do desenvolvimento da semente de tungue, provendo substrato para a atuação das enzimas FAD2 e FAD3, cujos genes apresentam os maiores níveis de transcritos ao final do desenvolvimento da semente (GALLI et al., 2014b). Após esse processo, os acil-ACP são hidrolizados pelas enzimas tioesterases acil-ACPs (FATA e FatB), as quais liberam os ácidos graxos para serem utilizados na síntese de TAGs no retículo endoplasmático (MORENO et al., 2010). Isso ocorre naturalmente em espécies superior vegetais, nos mais variados tipos de tecidos.

As desaturase são enzimas que removem dois hidrogênios e geram uma insaturação no local. No tungue existe um tipo especial de desaturase que transforma a ácido linoleico em α-ESA. Esta enzima é conhecida como FADx, que apresenta 73% de

similaridade de aminoácidos com a FAD2 e é expressa em grande quantidade no fruto (DYER et al., 2002). De acordo com Galli et al. (2014b), a expressão de FADx aumenta mais de 7000 vezes nas sementes maduras em comparação ao início do desenvolvimento da semente, confirmando a importância desta enzima na síntese de ácidos graxos em tungue.

A rota metabólica dos TAGs começa com a formação de diacilglicerol (DAG), o qual é gerado por duas vias: dependente ou independente de acil-CoA. Na via dependente de acil-CoA (rota de Kennedy), o acil-CoA é usado como substrato para a incorporação de três acil ao glicerol, através da ação subsequente das enzimas glicerol 3-fosfato acitransferase (G3PAT), ácido lisofosfatídico acil transferase (LPAT) e fosfatídico fosfatase (PAP) (LI-BEISSON et al., 2013). As enzimas diacilglicerol aciltransferase (DGAT) e fosfolipídio diacilglicerol aciltransferase (PDAT) então catalisam o final da rota dos diacilgliceróis (DAG) e o começo da síntese dos triacilgliceróis (TAG): a DGAT transfere um grupamento acil, na forma de acil-coenzima A, para um 1,2-diacilglicerol transformando-o em um triacilglicerol; enquanto que a PDAT transforma DAG em TAG através da transferência do grupamento acil proveniente de um fosfolipídio. Além disso existe a enzima diacilglicerol transacilase que transfere um grupamento acil de um DAG para outro DAG gerando assim um monoacilglicerol (MAG) e um TAG, essa rota é restaurada pela enzima monoacilglicerol aciltransferase que utilizada de um acil-coenzima A para restaurar um DAG através de um MAG (NELSON e COX, 2017).

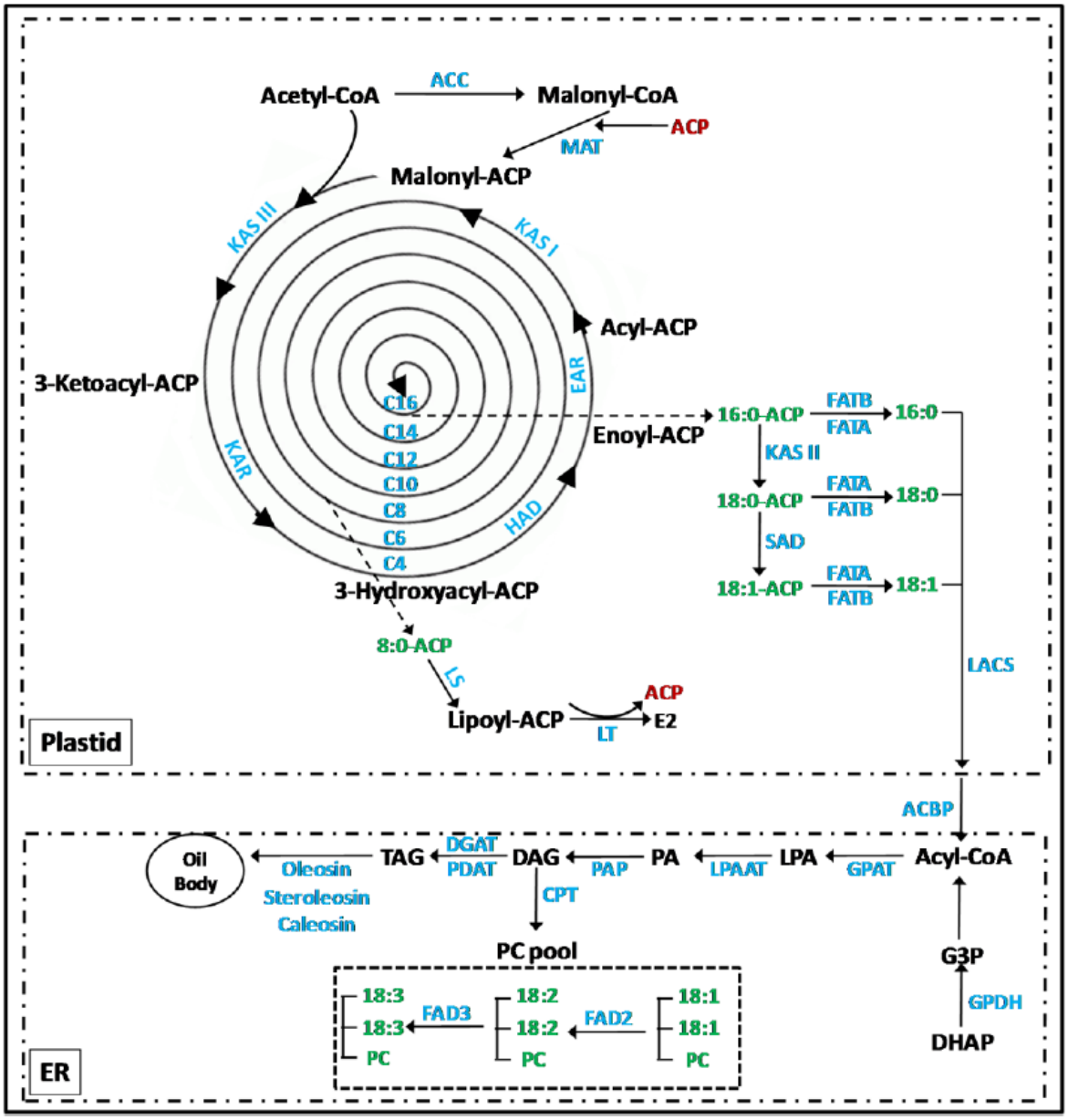

Figura 3 - Rota metabólica de síntese de lipídeos. ACC: acetil CoA carboxilase; ACP: proteína carreadora de acil; MAT: malonil CoA acil transferase; KAS: 3-cetoacil-ACP; KAR: 3-cetoacil-ACP redutase; HAD: hidroxiacil-ACP dehidratase; EAR: enoil-ACP redutase; LS: ácido lipóico sintase; LT: lipoiltransferase; FATA e FATB: acil-ACP tioesterases; SAD: estearoil ACP desaturase; LACS: acil-CoA sintetase de cadeia longa; ACBP: proteína ligadora de acil CoA; ER: retículo endoplasmático; GPAT: glicerol-3-fosfato aciltransferase; DHAP: dihidroxiacetonafosfato; GPDH: glicerol-fosfato desidrogenase; G3P: glicerol 3-fosfato; LPA: ácido lisofosfatidico; LPAAT: ácido lisofosfatídico acil transferase; PA: ácido fosfatídico; PAP: ácido fosfatídico fosfatase; DAG: diacilglicerol; DGAT: diacilglicerol aciltransferase; TAG: trialcilglicerol; PDAT: fosfolipídeo:diacilglicerol aciltransferase; CPT: colina fosfotransferase; PC: fosfatidilcolina; FAD2: delta-12-ácido graxo desaturase; FAD3: ômega-3-ácido graxo desaturase. Fonte: Galli et al. (2014b).

As isoformas da DGAT são as enzimas mais estudas no intuito do acumulo de ácidos graxos. DGAT1 e DGAT2 são geradas por genes únicos no genoma, sendo a primeira cópia expressa em níveis semelhantes nas folhas, flores e ao longo do desenvolvimento do fruto, e a segunda sendo fortemente expressa na síntese de óleos do fruto de tungue (SHOCKEY, 2006). Cao et al. (2013) reportaram a terceira DGAT de tungue, expressa em maior quantidade em folhas e frutos imaturos antes da biossíntese dos óleos.

Após sintetizados, os TAGs podem ser hidrolizados, liberando ácidos graxos, os quais são transportados aos peroxissomos, onde são estereficados a acil-CoA e entram em dois ciclos de β-oxidação, perdendo dois carbonos por vez no formato de acetil-CoA. A regulação desta etapa da rota metabólica também parece relevante visto que Cui et al. (2018), ao criarem um rascunho do transcriptoma através de sequenciamento *Whole-genome shotgun*, mostraram que além do aumento de expressão de genes da rota dos TAGs, genes associados à regulação da rota da β-oxidação apresentam aumento de expressão durante o desenvolvimento do fruto de tungue. Isso permitiu uma nova compreensão na regulação do acúmulo do α-ESA. Nesse estudo foi monitorado o acúmulo de óleo durante o desenvolvimento do fruto, o que permitiu identificar que a síntese inicia aos 112 dias após a antese (do inglês, DAP), aumentando até 120 DAP, apresentando o maior teor aos 137 DAP. Alguns dos genes envolvidos com o acumulo de ácidos graxo nos frutos aos 112 DAP estavam 8 vezes mais expressos, incluindo os genes que codificam para ACP, KASI, KASIII, e a cetoacil-ACP redutase (KAR). Somente três DGATs foram identificadas nesse estudo, sendo que a DGAT2 se mostrou fortemente expressa no endosperma da semente. Além disso, corroborando com o trabalho do Dyer et al. (2002), os genes que codificam para FAD2 e FADx tiveram um aumento de expressão aos 112 DAP até 130 DAP. O gene que codifica para PDAT apresentou níveis menores de expressão, comparados a DGAT2; no entanto as suas três isoformas (PDAT1A, 1B e 2) apresentaram aumento rápido na expressão coincidentes com os dias de acúmulo de α-ESA.

3.3 Silenciamento gênico mediado por miRNAs

O Ácido Ribonucleico (do inglês, RNA) é um tipo de molécula orgânica geralmente linear, que está envolvida na célula como parte fundamental na decodificação do genoma. O conjunto total de RNA de uma célula é chamado de transcriptoma, sendo o RNA mensageiro (mRNA) a molécula sintetizada no processo de transcrição, o qual usa a molécula de DNA como molde. O mRNA é então utilizado como molde na síntese proteica, sendo, portanto, um RNA codificante.

Dentre os RNAs não-codificantes, os RNA ribossômico e RNA transportador são os mais conhecidos. Além desses, uma série de outros RNAs não-codificantes tem sido identificados nos mais diversos organismos, incluindo os miRNAs ou microRNAs. MicroRNA é uma classe de RNA curto (do inglês, sRNA), de aproximadamente 22 pares de base (pb), de fita simples, não codificador, que regula a expressão gênica em muitos eucariotos. A sua descoberta foi no organismo *Caenorhabditis elegans* em 1993, e sua função foi identificada como regulador pós-transcricional (LEE et al., 1993; WIGHTMAN et al., 1993). A biogênese da molécula de miRNA inicia no núcleo, onde ocorre a transcrição de uma molécula de RNA denominada pri-miRNA pela RNA polimerase II. Esse RNA se assemelham a transcritos de mRNA, visto que possuem a estrutura CAP (5-metil guanosina) na extremidade 5’ da molécula, uma cauda poliadenilada na extremidade 3’, e sofrem rearranjo genético (*splicing*). No entanto, apresentam uma estrutura secundária em forma de alça (*loop*) ou grampo de cabelo (*hairpin*), característicos. Esse pri-miRNA é maturado no núcleo até se tornar pré-miRNAs; essa reação é catalisada por um tipo de RNAse III, a enzima Drosha, e pela enzima ligadora de RNA, Pasha, as quais efetuam um corte no pri-miRNA deixando duas bases 3´ do *hairpin*. Logo o pré-miRNA, que possui em torno de 70 pb, é levado ao citoplasma pela Exportina 5, e reconhecido por outra RNase III, a Dicer, a qual cliva-o gerando uma fita dupla de miRNA (duplex), cujas fitas são dissociadas e apresentadas à proteína Argonauta (Figura 4).

Os miRNAs tem como função a redução do *pool* de mRNAs na célula, funcionando através de um mecanismo conhecido como Complexo Silenciador Induzido por RNA (do inglês, RISC), onde uma proteína chamada Argonauta é guiada pelo miRNA associado

até seu alvo. Esse alvo é determinado pela sua hibridização ao miRNA (complementariedade de pares de bases). Esta hibridização resulta na clivagem e degradação do mRNA ou no bloqueio da tradução. Desta forma, esse processo acaba reduzindo a síntese de proteínas a partir desses mRNA alvos (KETTING, 2010).

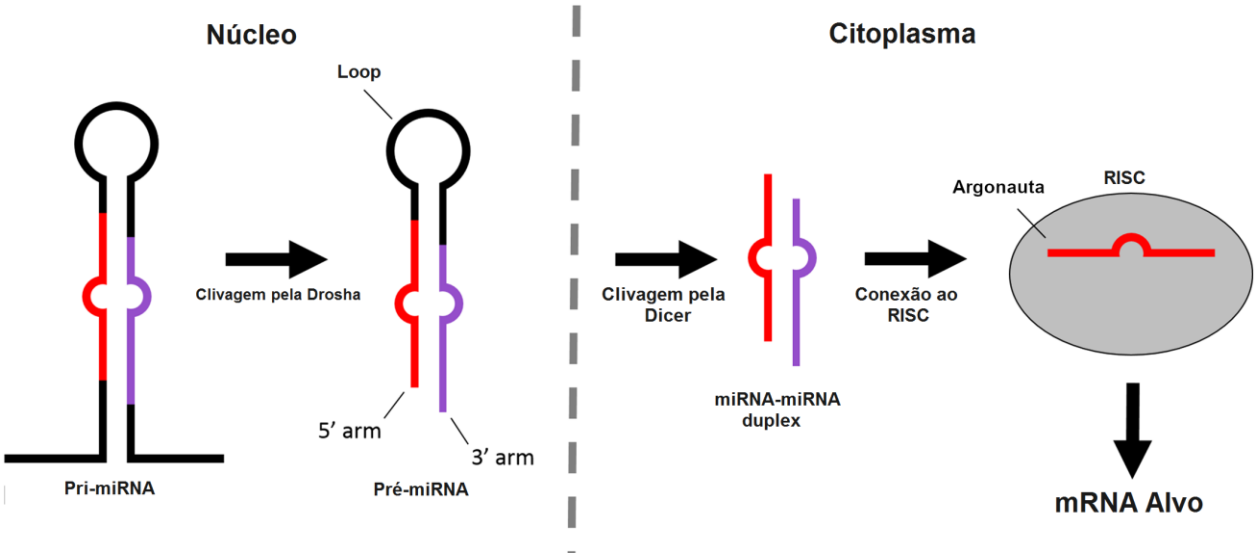

Figura 4 - Ilustração da síntese e funcionamento de um miRNA. Adaptado de McCreight et al., 2017.

Para análise de miRNAs existem diversas técnicas empregadas, como Northen blotting combinado com o gel de poliacrilamida desnaturante, que oferece informações sobre o tamanho e o acúmulo de um miRNA específico. Suas desvantagens são a baixa especificidade, a taxa de transferência e a relação entre o custo-efetividade (LÓPEZ-GOMOLLÓN, 2011).

O microarray é uma plataforma baseada em hibridização para a análise de expressão dos miRNAs. Geralmente usa-se uma sonda capaz de cobrir todos os miRNAs do genoma. Essa técnica oferece a possibilidade de examinar uma grande quantidade de amostras numa única utilização, no entanto não fornece nenhuma informação sobre o tamanho do miRNA, e o custo do equipamento dificulta aplicação (TIAN, 2015).

Por outro lado, o sequenciamento de nova geração possui uma melhor especificidade, conseguindo detectar uma grande amplitude de miRNAs, com uma grande taxa de transferência de dados. Além disso, não depende do conhecimento prévio da sequência. No entanto, esse método ainda é considerado o mais oneroso (GIT et al, 2010).

Técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) podem ser usadas para análise desses RNAs, em especial o PCR em tempo real (qPCR). Esta técnica possui a capacidade de definir em números relativos ou absolutos a expressão de moléculas através da fluorescência de substancias que possuem a capacidade de hibridização à ácidos nucleicos, por exemplo a sonda TaqMan, ou de se intercalar a ácidos nucleicos, como o SYBR Green. No caso do SYBR Green, ao complexar com a dupla fita de DNA, absorve luz no comprimento azul (λmax = 497 nm) e emite na cor verde (λmax = 520 nm), podendo ser captado por um sensor óptico. Ao ser adaptado a uma reação de PCR, com os ciclos de amplificação, a fluorescência passa a ser produzida de forma crescente ao longo dos ciclos, permitindo quantificar a abundância das moléculas amplificadas. No entanto, essa técnica funciona em moléculas de DNA, visto que moléculas de RNA são extremamente instáveis. Por isso, uma reação de transcrição reversa, ou seja, conversão de uma molécula de RNA em uma molécula de DNA complementar (cDNA), por intermédio da enzima transcriptase reversa, se faz necessária antes da realização da qPCR. Por isso esta técnica também é chamada de qRT-PCR, que, do inglês, significa *Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time* (GACHON e MINGAN, 2004).

O método de *stem-loop* foi uma modificação proposta por Chen et al. (2005) no RT-qPCR, devido que miRNAs menos abundantes no citoplasma escaparem da detecção por tecnologias como o Northem blot e Microarray. Essa estratégia melhora muito a especificidade e sensibilidade da reação. Para tal é utilizado uma porção do percursor de outro miRNA, essa sequência apresenta um loop, em união ao miRNA de interesse na reação da transcriptase reversa, logo no *real time* PCR é utilizado um primer *forward* especifico para o miRNA de interesse e um primer *reverse* universal que ancora na sequência do loop (Figura 5).

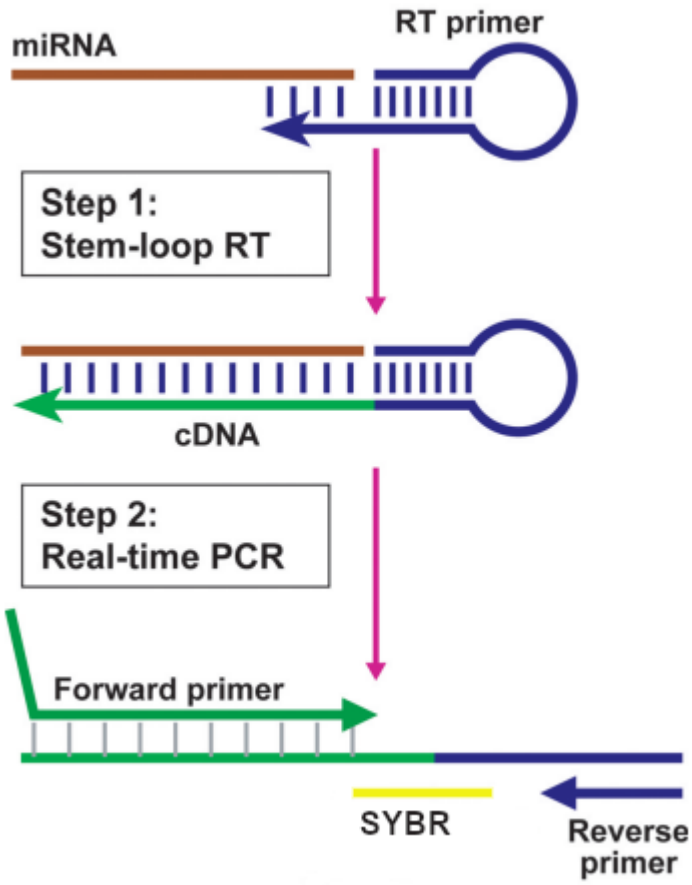

Figura 5 - Esquematização do método *stem-loop*. Os *primers* do *stem-loop primers* se ligam a porção do miRNA e são reversamente transcritos a cDNA. Entao, o produto do RT é quantificado por qPCR utilizando o fluoróforo SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain (InvitrogenTM) que inclui o miRNA de interesse e o outro miRNA. Adaptado de Chen et al. (2005)

4 Material e Métodos

4.1 Seleção dos miRNAs espécie-específicos de maior abundância em sementes maduras de tungue

Para a realização desse estudo foram selecionados apenas os miRNAs mais abundantes em sementes maduras de tungue. Para tanto, a seleção foi realizada a partir dos dados obtidos no estudo de Galli (2014a), onde foram identificados miRNAs conservados e espécie-específicos utilizando sequenciamento em larga escala de sRNAs e mRNAs de sementes maduras de tungue. Os bancos de mRNA e de sRNA estão depositado no GEO sob o número de acesso GSE50810. Nesse estudo, as sequências presentes no banco de sRNA foram alinhados aos precursores de miRNAs identificados utilizando Bowtie v 0.12.7 com os parâmetros padrões a fim de verificar a abundância dos miRNAs nesta biblioteca. A contagem das leituras foi realizada com auxílio da ferramenta SAMtools (version 0.1.16).

4.2 Predição da estrutura secundária dos precursores dos miRNAs (pré-miRNAs) selecionados

A estrutura secundária dos pré-miRNAs que originam os miRNAs selecionados foi predita utilizando a ferramenta MFOLD (http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rnaform1.cgi) utilizando os parâmetros padrões. Esta ferramenta também fornece a informação do MFE (do inglês, *minimal folding free energy*, em ΔG kcal/mol). Esse valor estima a estabilidade da estrutura secundária desse pré-miRNA. A partir desse valor, o AMFE (do inglês, *adjusted minimal folding free energy*) e o MFEI (do inglês, *minimal folding free energy ind*ex) foram calculados de acordo com Zhang et al. (2006). AMFE significa o MFE de uma sequência de RNA com 100 nt de comprimento, sendo calculado de acordo com a fórmula: MFE/(comprimento do pre-miRNA)*100. Por sua vez, o MFEI é igual a AMFE/% de GC, esse sendo um valor importante para definir a diferença computacional entre um mRNA e um pré-miRNA.

4.3 Determinação do gene-alvo dos miRNAs selecionados

A predição dos genes-alvo dos miRNAs selecionados foi realizada na ferramenta psRNAtarget (DAI E ZHAO, 2011) através do alinhamento dos miRNAs ao banco de transcritos obtido por Galli (2014a) a partir de amostras de sementes maduras de tungue. Foram utilizados os parâmetros padrão da ferramenta, utilizando 4.0 como o valor de *maximum expectation*. As sequências identificadas como alvos prováveis foram anotadas utilizando a ferramenta BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

4.4 Avaliação da expressão dos miRNAs selecionados por RT-qPCR

4.4.1 Amostras biológicas

Frutos de dois genótipos de tungue (identificados como 14RB e 15RB), de cinco estádios distintos (20, 35, 50, 80 e 100 dias após abertura floral - DAF) e uma folha do genótipo 15RB, foram coletados de uma estação experimental na sede da Embrapa Clima Temperado (-31°40'51.1"S 52°26'24.6"W) em Pelotas. As sementes foram manualmente removidas dos frutos e aproximadamente 10 sementes de cada estádio foram imediatamente submersas em nitrogênio líquido e armazenadas a – 80ºC até o momento das análises.

4.4.2 Extração de RNA e transcrição reversa

As sementes armazenadas foram maceradas utilizando gral e pistilo previamente autoclavados por 45 min a 121ºC e com auxílio de nitrogênio líquido a fim de manter resfriada a amostra. O RNA total foi isolado usando o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo os parâmetros do fabricante. A qualidade do RNA foi mensurada pela relação A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}, além da concentração através do equipamento NanoVue Plus™ (GE Healthcare).

Para a síntese de cDNA foi adicionado 8 µL de RNA a 1 µL de DNAse (Invitrogen) e 1 µl do tampão da DNAse, a fim de degradar o DNA remanescente da amostra. Esta reação ocorreu a 25ºC por 15 min. Após esse período, foi adicionado 1 µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 25 mM e foi incubado em termociclador a 65ºC por 10 min, para inativação da DNAse. Obtivemos assim um volume de 11 µL de RNA livre

de DNA. Foi adicionado então 3 µL de MirLoop, seguido de incubação em termociclador a 75ºC por 5 min. O MirLoop corresponde à mistura de todos os oligonucleotídeos que determinam quais os miRNAs se pretende transcrever de forma reversa. Esta determinação se deve ao fato de que esses oligonucleotídeos são desenhados de forma a se hibridizar aos seis últimos nucleotídeos do miRNA de interesse (seis nucleotídeos da extremidade 3' do miRNA), além da sequência correspondente à estrutura de *hairpin* do miRNA154, que serve, desta forma, como um extensor da sequência a ser transcrita. Essa abordagem é necessária devido aos miRNA serem extremamente pequenos dificultando, a sua visualização em análises de eletroforese e PCR em tempo real.

Após esta etapa, as amostras foram incubadas no gelo por 10 min e logo foi feito a reação em cadeia da polimerase da transcriptase reversa (RT-PCR). Para isso foi adicionado 6 µL de 5x FS buffer (tampão da transcriptase), 3 µL de ditiotreitol (DTT), 3 µL de Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTP´s) e 1 µL de M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen®) foram ao termociclador com o programa 16ºC por 30 minutos, 37ºC por 30 minutos, 85ºC por 5 minutos. Ao final do processo, todas as amostras foram diluídas para a concentração de 10 ng/µl.

4.4.3 Desenho dos *primers*

Para amplificação dos miRNAs selecionados, a sequência do *primer forward* corresponde à sequência integral do miRNA, enquanto que o *primer reverse* é comum para a amplificação de todos os miRNAs, por se hibridizar ao *hairpin* do miRNA154 utilizado na etapa de síntese de cDNA. Para a amplificação dos genes de referência, os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa Vector NT11 (Invitrogen) de forma a gerar um *amplicon* de aproximadamente 70 nucleotídeos, e com temperatura de anelamento de aproximadamente 60 °C, sem a formação de *hairpin* ou dímeros.

4.4.4 Amplificação do cDNA por PCR convencional

A fim de verificar a eficiência dos *primers* em amplificar os miRNAs de interesse nas amostras de cDNA sintetizadas, foi realizada uma PCR convencional. Para tanto, foram utilizadas as amostras 15RB (20 DAF) e 15RB (100 DAF), por apresentarem as maiores concentrações do RNA original. As reações foram constituídas de 11,25 µL de

tampão da polimerase, 6,75 µL de $MgCl_2$, 2,25 µL dNTP´s, 2,25 µL Taq (Polimerase termoestável), 4,5 µL *primer* reverse universal (hibridiza no harpin de mir154), 72 µL de agua MilliQ autoclavada e 9 µL do cDNA. Além dos *primers* para amplificação dos miRNAs selecionados, foram utilizados *primers* para amplificação dos genes de referência TUB (gene que codifica para a tubulina) e ACT (gene que codifica para a actina), descritos em Galli et al. (2014a).

4.4.5 Avaliação da expressão dos miRNAs por qRT-PCR

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) é uma técnica amplamente utilizada para a análise da expressão genica de organismos. O equipamento utilizado foi cedido pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal, do Instituto de Biologia da UFPel. O equipamento funciona através da leitura de um fluoróforo que tem a capacidade de se ligar a fitas duplas de DNA. Essa operação ocorre em uma placa de 96 poços, sendo que em cada placa foram analisados quatro *primers*, cada um com 24 poços. Para cada poço foi acrescido um volume total de 20 µL, sendo 19 µL do mix e 1 µL do cDNA a 10 ng/µL. Para formulação do mix foi acrescido 2 µL de tampão, 1,5 µL de $MgCl_2$, 0,2 µL de dNTP´s, 0,05 µL de Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), 0,5 µL de *primer forward* e 0,5 µL de *primer reverse*, 11,25 µL de agua milliQ estéril, 3 µL de SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen™). Na primeira placa foram analisados os *primers* 001_5p, 002_5p, 003_5p e TUB. Na segunda placa foram analisado os *primers* 005_5p, 006_5p, 012_5p e o gene da ACT. A análise foi realizada em placas de 96 poços, utilizando um Termociclador Bio-rad CFX Real Time, com os seguintes parâmetros de amplificação: 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 55 °C por 1 minuto com inserção da curva de *melting* de 65 a 95 °C, com incremento de 5 °C a cada medida de fluorescência.

Para normalização dos dados da RT-qPCR, foi utilizado o gene de referência TUB, sendo os dados calculados de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ e apresentados como expressão relativa.

5. Resultados e Discussão

Devido ao alto teor de óleo em suas sementes, o tungue tem despertado interesse principalmente para a fabricação de biodiesel. Além disso, uma característica desse óleo é a presença do ácido graxo α-ESA, que chega a representar de 75-80% do conteúdo de óleo. Esse ácido graxo apresenta três insaturações, sendo muito usado na indústria de tintas por sua qualidade secante. No entanto, apesar desse grande interesse na cultura, o tungue ainda não apresenta cultivares melhoradas em seus aspectos agronômicos, e são escassas as informações a respeito de aspectos moleculares da espécie. Para a obtenção de plantas melhoradas de tungue se faz relevante entender melhor os mecanismos atuando na regulação de genes de interesse. Sabe-se que os miRNAs atuam regulando negativamente a expressão gênica por levar à degradação de transcritos ou impedindo que esse seja traduzido em proteína. Por isso, esta classe de RNAs foi estudada com maiores detalhes nesse estudo, visando identificar aqueles com influência no processo de desenvolvimento das sementes de tungue, tecido esse de interesse para a indústria.

5.1 Seleção dos miRNAs espécie-específicos de maior abundância em sementes maduras de tungue

Levando em consideração a importância dos miRNAs, Galli (2014a) relatou o sequenciamento de mRNAs e miRNAs a partir de sementes de frutos maduros de tungue. Nesse estudo, foi demostrada a presença de vários miRNAs, sendo 138 presentes em diversas espécies pertencendo a 34 famílias conservadas. Além disso, 14 precursores ainda não descritos em outras espécies vegetais, designados como espécie-específicos para tungue, foram identificados nesse estudo e despertaram o interesse pois poderiam apresentar alguma associação com o conteúdo diferenciado de ácidos graxos presente nestas sementes. Após clivagem desse precursor pela enzima Dicer, diversas sequências, variando em tamanho (de 18-22 nucleotídeos) e abundância são produzidas. Por esse motivo, inicialmente, foi realizada uma ancoragem das sequências presentes no banco de sRNA a esses 14 precursores, visando identificar os que são produzidos em maior abundância (maior número de *reads* ancorados) nesse tecido, sendo, portanto, mais facilmente detectados em análises in vitro para validação de sua existência.

Esta análise permitiu identificar como mais abundantes as sequências descritas na Tabela 1. O miRNA Vfo_nMIR001_5p se mostrou o mais frequente em sementes maduras de tungue, com 5491 *reads*, seguido de Vfo_nMIR002_5p, Vfo_nMIR003_5p, Vfo_nMIR006_5p, Vfo_nMIR005_5p, e Vfo_nMIR012_5p, que apresentaram 3342, 1272, 412, 381 e 94 *reads*, respectivamente. Essas sequências foram então selecionadas para o desenho de *primers* para uso em qRT-PCR, utilizando a metodologia de *stem-loop* proposto por Chen et al. (2005). Para tanto, um *primer stem-loop* foi desenhado consistindo de 44 nucleotídeos conservados, que fazem parte do esqueleto do MIR154, além de seis nucleotídeos variáveis que são específicos à porção 3' do miRNA (5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACNNNNN3').
Esse *primer* foi desenhado para uso durante a síntese de cDNA, enquanto que para uso durante a reação de PCR em tempo real, o *primer forward* desenhado corresponde à própria sequência do miRNA e o *primer reverse* a uma sequência universal (GTGCAGGGTCCGAGGT) que hibridiza com o esqueleto do *stem-loop* (Tabela 1).

Tabela 1 - Abundância (número de *reads*) de miRNAs em sementes maduras de tungue e sequência de *primers* para amplificação por PCR em tempo real.

Nome	Primers	Reads
Vfo_nMIR001_5p	ACGTGCTCTCTCTCGTTGTCA	5491
Vfo_nMIR001_5p_stemlopp TTGTCA	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgcactggatacgacTGACAA	
Vfo_nMIR002_5p	CAAGTGTGAATGACCTGTGAGATG	3342
Vfo_nMIR002_stemlopp GAGATG	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgcactggatacgacCATCTC	
Vfo_nMIR003_5p	GGTATGGGAGGTCTTGGGAAAA	1272
Vfo_nMIR003_stemlopp GGAAAA	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgcactggatacgacTTTTCC	
Vfo_nMIR005_5p	GGAATGGGTGGAGTAGGTAAGA	381
Vfo_nMIR005_stemlopp GTAAGA	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgcactggatacgacTCTTAC	
Vfo_nMIR006_5p	TTGGAATCGGAATTTCGGAAA	412
Vfo_nMIR006_stemlopp CGGAAA	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgcactggatacgacTTTCCG	
Vfo_Nmir012_5p	TGACTCTGATTGGTTTGTGATACAG	94
Vfo_nMIR0012_stemlopp ATACAG	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgcactggatacgacCTGTAT	

5.2 Predição da estrutura secundária dos precursores dos miRNAs (pré-miRNAs) selecionados

Para verificar a veracidade dos pré-miRNAs espécie-específicos, sua estrutura secundária foi predita utilizando a ferramenta online MFOLD

(http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold). As estruturas secundárias obtidas estão contidas na Figura 6. Esta ferramenta também fornece o valor de MFE, o qual, juntamente com o tamanho e a porcentagem de ligações GC do precursor foram utilizados para calcular os valores de AMFE e MFEI, que estão apresentados na Tabela 2. Considerando que quanto menor o MFE mais termoestável é a estrutura secundária do pré-miRNA, a sequência Vfo_nMIR006_5p se mostra a estrutura mais confiável, com valor MFE de -77,5; enquanto que o maior MFE corresponde à sequência Vfo_nMIR012_5p (-24,6). Já o valor de MFEI é importante para distinguir um mRNA de um pré-miRNA, sendo o limiar para pré-miRNA ≤ -0,85. A única sequência que não teve esse valor atingido foi Vfo_nMIR012_5p, sendo que esta apresentou mais de uma estrutura predita pelo MFOLD, na tentativa de determinar a que refletisse em maior estabilidade termodinâmica. Na figura 6, apenas a estrutura com menor MFE para esse precursor foi representada.

É possível observar na porção inferior da figura uma tentativa de ajuste de alguns nucleotídeos na porção 5'. Uma vez que a determinação do tamanho desta sequência é baseada em pré-requisitos determinados pelo analisador, a retirada desses nucleotídeos excedentes poderia ser realizada. Por esse motivo, esta sequência foi reformulada, onde a sequência CTAACTGGATCACCTCTTCAGAACAA presente na porção 5', e a sequência GAAG na porção 3' foram removidas, formando assim a estrutura representada na Figura 7, com 108 nucleotídeos, MFE de -22,1, AMFE de -20,46, e -0,325 de MFEI. Mesmo apresentando um MFE superior à estrutura anterior, a porção 3´ do percursor aparenta estar incompleta, inviabilizando a manutenção da extremidade 5'.

Vishwakarma e Jadeja (2013), realizaram um trabalho semelhante a fim de identificar miRNAs espécie-especifico em *Jatropha curcas*, através da extração de RNA total, seguida da separação da fração correspondente a sRNAs em uma corrida eletroforética e sequenciamento desses sRNAs, criando assim um banco de sRNA-Seq. Os autores utilizaram sequências de miRNAs de *Viridiplantae* previamente identificados contra esse banco de RNA-Seq, resultando em 48 sequências candidatas para a análise de estrutura secundaria. Esses autores utilizaram como ponto de corte um MFEI menor de -0,85 para distinguir os miRNAs de outros RNA não- codificantes e dos codificantes. Por outro lado, Xu et al. (2013), utilizaram como parâmetros para a identificação de novos

miRNAs em *Ricinus* communis, um valor de MFE de clivagem da Dicer igual a 25 kcal/mol e a estrutura precisava possuir um *hairpin* característico, utilizando a ferramenta mFOLD e a pipeline MIREAP para a análise da estrutura, e o software miRDeep para a clivagem da enzima. Como resultado 72 novos miRNAs e seus possíveis percussores foram anotados e 20 novos miRNAs foram validados.

Tabela 2 - pre-miRNAs e valores de MFE, AMFE e MFEI

Pre-miRNA	MFE	Tamanho	AMFE	%GC	MFEI
Vfo_nMIR001	**-47,2**	115	-41,0435	43,48	-0,94396
Vfo_nMIR002	**-51,8**	87	-59,5402	42,53	-1,39996
Vfo_nMIR003	**-59,7**	122	-48,9344	41,8	-1,17068
Vfo_nMIR005	**-34,4**	71	-48,4507	46,48	-1,0424
Vfo_nMIR006	**-77,5**	203	-38,1773	36,95	-1,03322
Vfo_nMIR012	**-24,6**	138	-17,8261	34,06	-0,52337

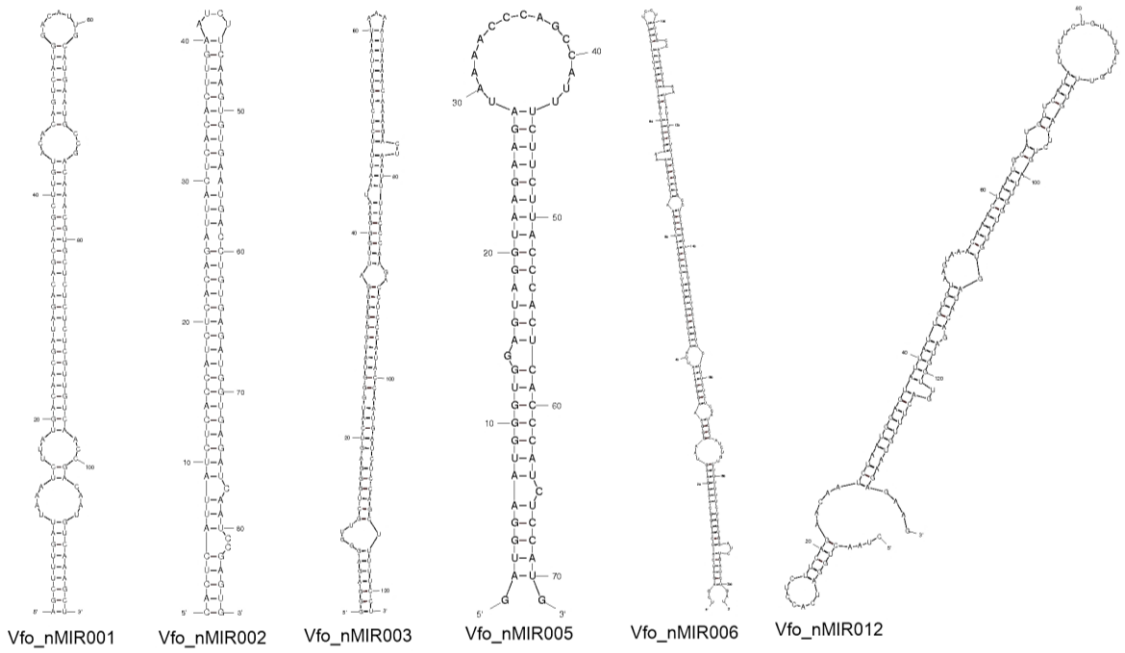

Figura 6 - Estrutura secundaria dos pré-miRNAs Vfo_nMIR001, Vfo_nMIR002, Vfo_nMIR003, Vfo_nMIR005, Vfo_nMIR012

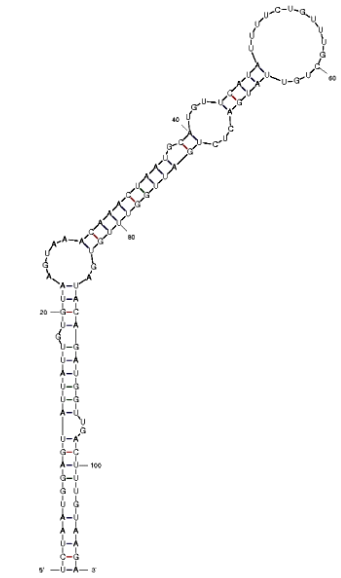

Figura 7- Reformulação da estrutura secundária do Vfo_nMIR012

5.3 Determinação do gene-alvo dos miRNAs selecionados

A fim de determinar o papel desempenhado pelos miRNAs espécie-específicos mais abundantes identificados em sementes maduras de tungue, seus alvos foram preditos utilizando a ferramenta psRNAtarget. Os alvos preditos foram então anotados usando Blast contra o banco de dados do NCBI (https://ncbi.nlm.nih.gov) e do UniProt (https://www.uniprot.org/). Para isso foi usado um ponto de corte de até 4 para *expectation value* fornecido pela ferramenta, sendo que quanto menor esse valor, maior a chance de ocorrer a inibição. Essa inibição pode ser de dois tipos, através do recrutamento do RISC para a clivagem do alvo ou somente por bloqueio de tradução, não permitindo a leitura ribossomal. Os dados estão representados na Tabela 3.

Os melhores resultados, com *expectation value* de 1,5 para o Vfo_nMIR001_5p remeteram a dois alvos que foram identificados como homólogos de sequências de RNA não codificantes (*no-coding RNA*, ncRNA) de *Jatropha curcas* (pinhão-manso). Esta classe de RNA apresenta sequências grandes não-codificantes, envolvidas na regulação genética (AKHADE et al., 2017). Outros alvos preditos com valores maiores de

expectation value incluíram o transcrito que codifica para carboxipeptidase Y, e o que codifica para uma proteína com propriedades de ligação a DNA identificada como *homeobox-leucine zipper protein ATHB-6-like*, ambas homólogas a *Hevea brasiliensis*. Esta última proteína interage com promotores de genes envolvidos com a resposta ao estresse hídrico dependente do ácido abscísico (ABA), sendo um controlador negativo da via de sinalização do ABA (SÖDERMAN et al., 1999).

O alvo predito para Vfo_nMIR002_5p, com *expectation value* de 1,5, corresponde a uma sequência que codifica para a proteína GFS12, uma proteína quinase que suprime o BCHC1, fator negativo na regulação do tráfego de membranas para o vacúolo de armazenamento de proteínas (do inglês, *protein storage vacuole*) e na imunidade inata através de ETI (do inglês, *effector triggered immunity*) (TEH et al., 2015).

Tabela 3 - Alvos dos miRNAs selecionados

miRNA	Alvo (Acesso Genbak)	Espécie	*Expectation value*	Nome do alvo	Descrição		Tipo de inibição
Vfo_nMIR001	XR_002285553.1	Jatropha *curcas*	1,5	ncRNA	-	miRNA 21 ACUGUUGCUCUCUCUCGUGCA 1 :::::.:::::::::::::: Target 124 UGACGACGAGAGAGAGCACGC 144	Clivagem
Vfo_nMIR001	XR_002285553.1	*Jatropha curcas*	1,5	ncRNA	-	miRNA 21 ACUGUUGCUCUCUCUCGUGCA 1 :::::.:::::::::::::: Target 84 UGACGACGAGAGAGAGCACGC 104	Clivagem
Vfo_nMIR001	XM_007836618.1	*Hevea brasiliensis*	2,5	Carboxypeptidase Y	Carbpep_Y_N, Peptidase_S10,	miRNA 21 ACUGUUGCUCUCUCUCGUGCA 1 ::::.:::: :.:::::::: Target 403 CGACAGCGAGUGGGAGCACGU 423	Tradução
Vfo_nMIR001	XM_021832656.1	*Hevea* brasiliensis	2,5	homeobox-leucine zipper protein ATHB-6-like	DNA binding, Homeobox,specific DNA base contacts [nucleotide binding], Homeobox associated leucine zipper	miRNA 21 ACUGUUGCUCUCUCUCGUGCA 1 ::::: ::::::::::.: Target 98 AAACAACUAGAGAGAGCAUGA 118	Clivagem
Vfo_nMIR002	XM_020683035.1	*Jatropha* curcas	1,5	protein GFS12 isoform X1	2 Pkc (protein kinases catalic), 1 Beach, 9 WD40	miRNA 24 GUAGAGUGUCCAGUAAGUGUGAAC 1 .:::::::.::::::::.::: Target 2856 CAGACUACAGGUUAUUCACAUUUG 2879	Clivagem
Vfo_nMIR003	XM_021800037.1	Hevea *brasiliensis*	2,5	F-box/LRR-repeat protein 14-like	multiplas leucine-rich, AMN1	miRNA 22 AAAAGGGUUCUGGAGGGUAUGG 1 : ::.::::::.:::::: ::: Target 1621 UCUUUCCAAGAUCUCCCAAACC 1642	Clivagem

Continuação da Tabela 3.

miRNA	Alvo (Acesso Genbak)	Espécie	*Expectation value*	Nome do alvo	Descrição		Tipo de inibição
Vfo_nMIR003	XM_020683404.1	*Jatropha curcas*	2,5	probable polygalacturonase At1g80170 isoform X2	PI-6	miRNA 22 AAAAGGGUUCUGGAGGGUAUGG 1 :::::::::::.::: ::::. Target 743 CCUUCCCAAGACUUCCAAUACU 764	Clivagem
Vfo_nMIR005	XM_012219911.2	*Jatropha curcas*	2,5	TMV resistance protein N isoform X1	TIR,NB-ARC, multiplas leucine-rich	miRNA 22 AGAAUGGAUGAGGUGGGUAAGG 1 ::::.::::.:::::: ::::: Target 3574 UCUUGCCUAUUCCACCGAUUCC 3595	Clivagem
Vfo_nMIR006	XR_002285590.1	*Jatropha curcas*	2,0	WD repeat-containing protein 26	multiplos WD40	miRNA 21 AAAGGCUUUAAGGCUAAGGUU 1 ::: :.::::.:::::::: Target 10 AGUCCCAGAUUCUGAUUCCAA 30	Clivagem
Vfo_nMIR006	XM_021743874.1	*Manihot esculenta*	2,5	carboxyl-terminal-processing peptidase 1, chloroplastic isoform X1	Peptidase_S41,Catalytic dyad	miRNA 21 AAAGGCUUUAAGGCUAAGGUU 1 :. ::::::.::::::::. Target 65 GCUUGGAAAUUUCGAUUCCAG 85	Clivagem
Vfo_nMIR012	XM_021802928.1	*Hevea brasiliensis*	3,0	AP-3 complex subunit delta isoform X2	Adaptin_N, 3 HEAT repeat	miRNA 25 GACAUAGUGUUUGGUUAGUCUCAGU 1 ::. :::. :::::::: ::::: Target 74 AAGUGACACGUACCAAUCAAAGUCA 98	Clivagem

Para o Vfo_nMIR003_5p, o transcrito que codifica para a proteína *F-box/LRR-repeat protein 14* foi predito como alvo, com o menor *expectation value* de 2,5. Esta proteína pode estar envolvida no processo de ubiquitinação, regulando a degradação de proteínas nas células (VIÑAS-CASTELLS et al., 2010). Outro alvo predito para esse miRNA foi a poligalacturonase, homóloga a de *Jatropha curcas*, a qual é uma hidroxilase que participa da organização da parede celular e do metabolismo dos carboidratos (KIM et al., 2006).

O alvo predito do Vfo_nMIR005_5p é a proteína de resistência ao vírus do mosaico do tabaco (*expectation value* de 2,5), com função de ligante à proteína de virulência do vírus (DINESH-KUMAR et al., 2000). Com *expectation value* de 2,0, o alvo predito para Vfo_nMIR006_5p corresponde ao transcrito que codifica para a proteína *WD repeat-containing protein 26*, homóloga de *Jatropha curcas*. Esta proteína é constituída de múltiplas repetições do domínio WD40 conhecido como beta-transducina. Esse domínio está ligado a inúmeras funções de coordenação de conjuntos multiproteicos, envolvendo a transdução de sinais, desde o ciclo celular, autofagia até a apoptose, o alvo pode ser então uma subunidade proteica de regulação (CHUANG et al., 2015). Aumentando o *expectation value* para 2,5, o alvo predito para esse miRNA é a proteína *carboxyl-terminal-processing peptidase 1*, uma protease envolvida no processamento C terminal da proteína cloroplástica D1 do fotossistema II, essencial para a montagem da estrutura que dirige a luz ao manganês tetranuclear, responsável pela oxidação fotossintética da água (TROST et al., 1997).

Por fim, com um *expectation value* de 3,0, o alvo predito para Vfo_nMIR012_5p é uma homóloga de *Hevea brasiliensis*, designada como subunidade delta do complexo proteína AP-3, e parece estar associada à clatrina, proteína importante na formação de vesículas no Golgi. A AP-3 é importante

também na manutenção dos vacúolos líticos e na transição dos vacúolos de armazenamento para os líticos (ZWIEWKA et al., 2011).

A maioria dos alvos tiveram regulação predita por clivagem. Em plantas a clivagem por miRNA guiados por proteínas é a principal função de inibição pós-transcricional (JONES-RHOADES et al., 2006). No entanto, ainda é possível a inibição por bloqueio de tradução, regulação esta predita para um dos alvos preditos para o Vfo_nMIR001_5p, com *expectation value* de 3,5.

5.4 Avaliação da expressão dos miRNAs selecionados por RT-qPCR

Para a avaliação dos miRNA, foi utilizado o protocolo do TRIzol (Invitrogen), seguido de precipitação com álcool. Esse é o método mais utilizado para o isolamento de RNAs totais incluindo miRNAs, que permite aos pesquisadores analisar todos os RNAs de uma amostra, sendo o método mais robusto para as análises de expressão (MRAZ et al., 2009). Depois de isolado esse RNA foi submetido à analise em espectrofotometria, usando as relações A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280}, uma vez que a leitura a 260 nm corresponde à quantificação de ácidos nucleicos, a leitura aa 230 nm permite a determinação de fenóis, compostos aromático ou carboidratos, e a leitura a 280 nm determina a concentração proteica na amostra. O valor esperado para ambas as razões deve ser maior que 1,8 e menor que 2,2. Geralmente A_{260}/A_{230} não atinge esse ideal em extrações com Trizol visto que o reagente apresenta compostos fenólicos em sua composição, podendo ser difícil a remoção na amostra final.

Nas amostras de sementes de tungue, a concentração do RNA total variou de 147,6 a 43,2 ng/µl, sendo os menores valores obtidos a partir de amostras da cultivar 14RB e os maiores da cultivar 15RB (Tabela 4). A relação A_{260}/A_{280} ficou entre 2,2 a 2,0, valor parecido para todas amostras, sugerindo uma amostra livre de contaminação proteica. Por outro lado, a relação A_{260}/A_{230} teve uma variação de 2,5 a 0,73 indicando que algumas amostras não resultaram em RNA com qualidade adequada, pois existem relatos de que os contaminantes remanescentes na amostra podem interferir na atuação da transcriptase reversa durante o processo

de síntese do cDNA, e da polimerase utilizada na PCR subsequente (SCHRADER et al., 2012). Esse valor baixo pode ter sido gerado pelo fato da semente de tungue possuir uma alta quantidade de ácidos graxos insaturados, que são altamente suscetíveis à oxidação (SHANG et al., 2009). Os valores de concentração e qualidade do RNA estão apresentados na Tabela 4. Pinto et al. (2009) teve relações A_{260}/A_{230} abaixo do 1,8 ao utilizar o reagente Trizol em cianobactéria, o mesmo foi observado por Messias et al. (2014) no qual usou diversos métodos de extração de RNA total em diferentes variedades de grãos de milho. E o mesmo aconteceu com Bilgin et al., (2009) em soja onde fez extração de RNA total com diversos métodos, sendo o pior índice o A_{260}/A_{230} com o método Trizol.

Depois do isolamento do RNA total, o cDNA foi sintetizado e utilizado na confecção das placas do PCR em real time, resultando nos valores de expressão relativa observados nas Figuras 8 e 9. É possível observar que todos os miRNAs avaliados foram amplificados por PCR, corroborando com a validação e a predição *in silico*. Para os dois genótipos, em todos os miRNAs analisados, foi observado um aumento na expressão ao longo do desenvolvimento e amadurecimento da semente, com um aumento evidente aos 100 dias após a abertura floral (DAF).

Os valores de expressão relativa do miRNA Vfo_nMIR001_5p variaram de 0,24 até 521 para o genótipo 14RB e para o 15RB a variação foi de 0,5 a 203. Os valores de Vfo_nMIR002_5p variaram para o genótipo 14RB de 0,12 a 40 e para o 15RB de 0,14 a 57. Já o miRNA Vfo_nMIR003_5p variou de 0,55 a 35 para o 14RB e de 0,47 a 94,6 para o 15RB. Para ambas os genótipos tivemos um comportamento parecido em relação aos miRNAs na expressão ao longo do desenvolvimento, a regulação por RNAi parece aumentar no final do desenvolvimento da semente, coincidindo com os dias de maior acúmulo de óleo.

Para os alvos do miRNA Vfo_nMIR005_5p, houve a variação para a cultivar 14RB de 0,1 a 70 e para a 15RB 0,36 a 191,5. Para o miRNA Vfo_nMIR006_5p variou de 0,38 a 56,8 para a 14RB e para a 15RB 0,18 a 111. Por fim a Vfo_nMIR012_5p variou para a cultivar 14RB 0,1 a 127 e para a 15RB 0,1 a 77.

Para a 15RB tivemos que a amostra de 20 DAF não houve uma expressão para nem uma dos *primers* nesse genótipo, provavelmente isso indica um erro técnico. Já a análise da amostra de folha que fizemos para esse genótipo teve expressão para o Vfo_nMIR001_5p de 4,3, para Vfo_nMIR002_5p de 3,4, para o Vfo_nMIR003_5p de 7,2, para o Vfo_nMIR005_5p de 6,9, para o Vfo_nMIR006_5p de 3,9 e para o Vfo_nMIR012_5p de 2,4. Esses resultados indicam que para a cultivar 15RB os frutos no final de seu desenvolvimento possuem uma maior expressão desses miRNAs do que em folhas, sugerindo uma regulação mais negativa nesses últimos estádios.

Tabela 4 - Quantificação e qualidade do RNA isolado de sementes de tungue de dois genótipos.

Genótipo	Estádios (Dias após abertura floral)	Concentração ng/µL	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
15RB	20	147,6	2,14	1,21
	35	53,6	2,09	2,71
	50	68,4	2,16	0,74
	80	56	2,09	2,50
	100	146,4	2,06	2,27
	Folha	58,8	2,01	2,04
14RB	20	45,2	2,09	2,26
	35	49,2	2,19	0,73
	50	102	2,17	1,90
	80	52,4	2,07	2,47
	100	43,2	2,00	2,00

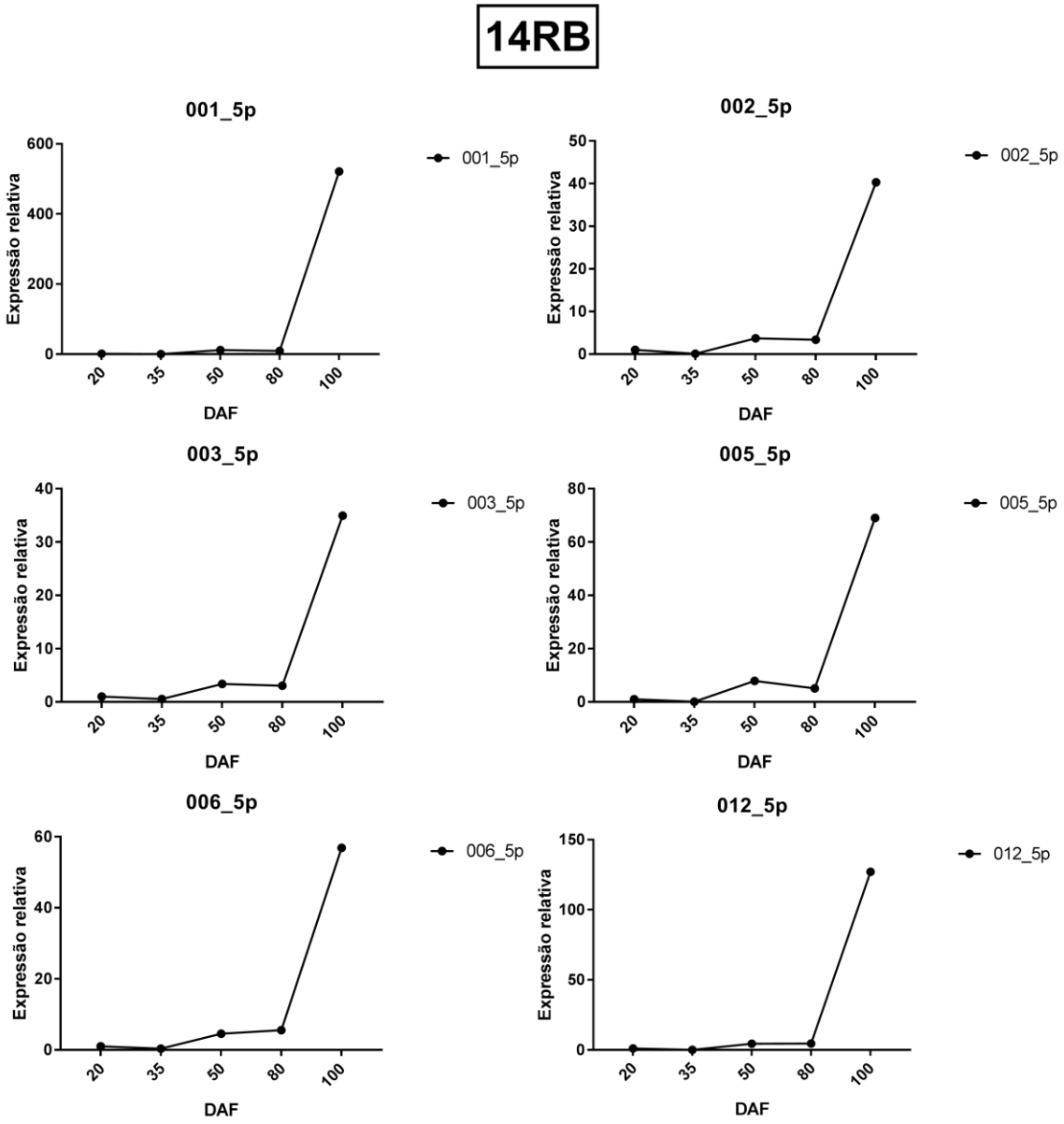

Figura 8 - Expressão relativa dos miRNAs ao longo do desenvolvimento de sementes de tungue do genótipo 14RB.

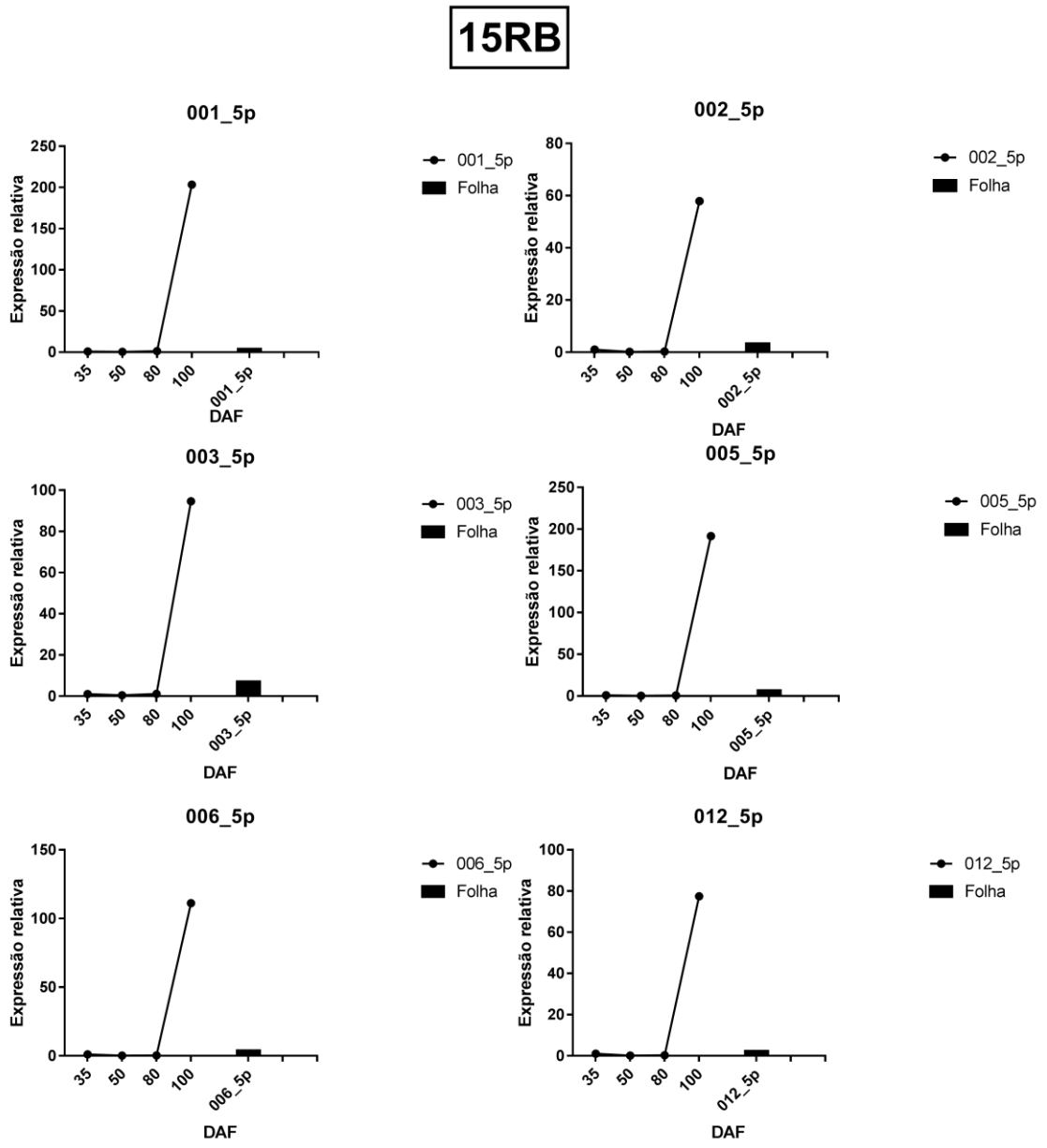

Figura 9 - Expressão relativa dos miRNAs ao longo do desenvolvimento de sementes de tungue do genótipo 15RB

6 Conclusão

A regulação gênica pós-transcricional é um sistema muito complexo, a interação dos miRNAs com seus alvos é dependente de diversos fatores. No presente trabalho foi elucidado por PCR em tempo real e caracterizado via analises de bioinformática, 6 novos miRNAs propostos por Galli (2014a), ao longo do desenvolvimento do fruto. Conseguimos predizer os alvos possíveis, como também as estruturas dos pré-miRNAs de cada um dos propostos, identificamos a presença dos miRNA em diferentes estádios, dando ênfase ao últimos estádio, o de maior acumulo de óleos, com a maior expressão desses, sugerindo assim uma importância desses miRNAs. Ficam ainda duvidas referentes ao processo de regulação dos frutos, e em estudos futuros talvez descubram miRNAs que estejam envolvidos no controle das enzimas da síntese de óleo diretamente, e que esses sirvam de base para produção de genótipos mais produtivos.

O trabalho me proporcionou conhecer novos horizontes dentro da biologia molecular vegetal, permitindo explorar o campo dos biocombustíveis, isso aumentou ainda mais meu gostou pela genômica e suas áreas afins. Espero ter contribuído para a área, e que esse trabalho sirva de alicerce para novas tecnologias.

Referências

AKHADE, Vijay Suresh; PAL, Debosree; KANDURI, Chandrasekhar. Long noncoding RNA: Genome organization and mechanism of action. In: **Long Non Coding RNA Biology**. Springer, Singapore, 2017. p. 47-74.

BILGIN, Damla D.; DELUCIA, Evan H.; CLOUGH, Steven J. A robust plant RNA isolation method suitable for Affymetrix GeneChip analysis and quantitative real-time RT-PCR. **Nature protocols**, v. 4, n. 3, p. 333, 2009.

BLACKMON, G. H. The tung-oil industry. **The Botanical Review**, v. 9, n. 1, p. 1-40, 1943.

BROWN, Karen; KEELER, William. The history of tung oil. **Wildland weeds**, v. 9, n. 1, p. 4-24, 2005.

CAO, Heping et al. Developmental regulation of diacylglycerol acyltransferase family gene expression in tung tree tissues. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e76946, 2013.

CAHOON, Edgar B. et al. Conjugated fatty acids accumulate to high levels in phospholipids of metabolically engineered soybean and Arabidopsis seeds. **Phytochemistry**, v. 67, n. 12, p. 1166-1176, 2006.

CHEN, Caifu et al. Real-time quantification of microRNAs by stem–loop RT–PCR. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 20, p. e179-e179, 2005.

CHUANG, Huey-wen et al. An Arabidopsis WDR protein coordinates cellular networks involved in light, stress response and hormone signals. **Plant Science**, v. 241, p. 23-31, 2015.

CUI, Peng et al. Tung Tree (Vernicia fordii, Hemsl.) Genome and Transcriptome Sequencing Reveals Co-Ordinate Up-Regulation of Fatty Acid β-Oxidation and Triacylglycerol Biosynthesis Pathways During Eleostearic Acid Accumulation in Seeds. **Plant and Cell Physiology**, v. 59, n. 10, p. 1990-2003, 2018.

DAI, Xinbin; ZHAO, Patrick Xuechun. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. **Nucleic acids research**, v. 39, n. suppl_2, p. W155-W159, 2011.

DINESH-KUMAR, S. P.; THAM, Wai-Hong; BAKER, Barbara J. Structure–function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene N. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 26, p. 14789-14794, 2000.

DYER, John M. et al. 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.

DYER, John M. et al. Production of linolenic acid in yeast cells expressing an omega-3 desaturase from tung (Aleurites fordii). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 7, p. 647-651, 2004.

EICHOLZ, Marcel Diedrich. Caracterização de Populações de Tungue (Aleurites fordii Hemsl.) no do Rio Grande do Sul. 2013. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pelotas.

GACHON, Claire; MINGAM, Annaïck; CHARRIER, Bénédicte. Real-time PCR: what relevance to plant studies?. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 402, p. 1445-1454, 2004.

GALLI, Vanessa et al. Identifying microRNAs and transcript targets in Jatropha seeds. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e83727, 2014a.

GALLI, Vanessa et al. Transcriptome of tung tree mature seeds with an emphasis on lipid metabolism genes. **Tree genetics & genomes**, v. 10, n. 5, p. 1353-1367, 2014b.

GIT, Anna et al. Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. **Rna**, 2010.

IMAHARA, H., Minami, E., Saka, S., 2006. Thermodynamic study on cloud point of biodiesel with its fatty acid composition. **Fuel** 85, 1666–1670.

JONES-RHOADES, Matthew W.; BARTEL, David P.; BARTEL, Bonnie. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 57, p. 19-53, 2006.

KETTING, René F. MicroRNA biogenesis and function. In: Regulation of microRNAs. **Springer**, New York, NY, 2010. p. 1-14.

KIM, Joonyup et al. Patterns of expansion and expression divergence in the plant polygalacturonase gene family. **Genome biology**, v. 7, n. 9, p. R87, 2006.

KNOTHE, G., Matheaus, A.C., Ryan III, T.W., 2003. Cetane numbers of branched and straight-chain fatty esters determined in an ignition quality tester. **Fuel** 82, 971–975.

KNOTHE, G., Steidley, K.R., 2005. Lubricity of components of biodiesel and petrodiesel. The origin of biodiesel lubricity. **Energy Fuels** 19, 1192–1200.

LEE, Rosalind C.; FEINBAUM, Rhonda L.; AMBROS, Victor. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.

LIST, P. H.; HOERHAMMER, L. 1980. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. **Springer** 8 vols. 1969.

LÓPEZ-GOMOLLÓN, Sara. Detecting sRNAs by Northern blotting. In: MicroRNAs in Development. **Humana Press**, 2011. p. 25-38.

MCCREIGHT, Jennifer C. et al. Evolution of microRNA in primates. **PloS one**, v. 12, n. 6, p. e0176596, 2017.

MESSIAS, Rafael da Silva et al. Isolation of high-quality rna from grains of different maize varieties. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 7, p. 697-707, 2014.

MRAZ, M. et al. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 390, n. 1, p. 1-4, 2009.

MURPHY, Denis J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in lipid research**, v. 40, n. 5, p. 325-438, 2001.

MUTANTS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 33, p. 20348-20356, 1997.

NELSON, David L.; LEHNINGER, Albert L.; COX, Michael M. Lehninger principles of biochemistry. Macmillan, 2008.

OHLROGGE, John B.; JAWORSKI, Jan G. Regulation of fatty acid synthesis. **Annual review of plant biology**, v. 48, n. 1, p. 109-136, 1997POTTER, George F. The domestic tung industry. I. Production and improvement of the tung tree. **Economic Botany**, v. 13, n. 4, p. 328-342, 1959.

PAN, Yue et al. Development of microsatellite markers in the oil-producing species Vernicia fordii (Euphorbiaceae), a potential biodiesel feedstock. **Applications in plant sciences**, v. 1, n. 7, p. 1200004, 2013.

PINTO, Fernando Lopes et al. Analysis of current and alternative phenol based RNA extraction methodologies for cyanobacteria. **BMC molecular biology**, v. 10, n. 1, p. 79, 2009.

SCHRADER, C. et al. PCR inhibitors–occurrence, properties and removal. **Journal of applied microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1014-1026, 2012.

SHANG, Qiong et al. Properties of Tung oil biodiesel and its blends with 0# diesel. **Bioresource technology**, v. 101, n. 2, p. 826-828, 2010.

SHOCKEY, Jay et al. Tung (Vernicia fordii and Vernicia montana). In: **Industrial Oil Crops**. 2016. p. 243-273.

SÖDERMAN, Eva et al. The HD-Zip gene ATHB6 in Arabidopsis is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. **Plant molecular biology**, v. 40, n. 6, p. 1073-1083, 1999.

TEH, Ooi-kock et al. BEACH-domain proteins act together in a cascade to mediate vacuolar protein trafficking and disease resistance in Arabidopsis. **Molecular plant**, v. 8, n. 3, p. 389-398, 2015.

TIAN, Tian; WANG, Jiaqi; ZHOU, Xiang. A review: microRNA detection methods. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 13, n. 8, p. 2226-2238, 2015.

TROST, Jeffrey T. et al. The D1 C-terminal Processing Protease of Photosystem II from Scenedesmus obliquus PROTEIN PURIFICATION AND GENE CHARACTERIZATION IN WILD TYPE AND PROCESSING

VANHERCKE, Thomas et al. Synergistic effect of WRI1 and DGAT1 coexpression on triacylglycerol biosynthesis in plants. **Febs Letters**, v. 587, n. 4, p. 364-369, 2013.

VIÑAS-CASTELLS, Rosa et al. The hypoxia-controlled FBXL14 ubiquitin ligase targets SNAIL1 for proteasome degradation. **Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 6, p. 3794-3805, 2010.

VISHWAKARMA, Nutan Prakash; JADEJA, Vasant J. Identification of miRNA encoded by Jatropha curcas from EST and GSS. **Plant signaling & behavior**, v. 8, n. 2, p. e23152, 2013.

WIGHTMAN, Bruce; HA, Ilho; RUVKUN, Gary. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 855-862, 1993.

XU, Wei et al. Transcriptome-wide identification and characterization of microRNAs from castor bean (Ricinus communis L.). **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e69995, 2013.

LI-BEISSON, Yonghua et al. Acyl-lipid metabolism. **The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists**, v. 11, 2013.

ZWIEWKA, Marta et al. The AP-3 adaptor complex is required for vacuolar function in Arabidopsis. **Cell research**, v. 21, n. 12, p. 1711, 2011.