

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Caracterização *in silico* dos genes *VfDGATs* e *VfFADs* e ensaios preliminares
para clonagem em vetor viral**

Vitória Hirdes Glenzel

Pelotas, 2019

Vitória Hirdes Glenzel

**Caracterização *in silico* dos genes *VfDGATs* e *VfFADs* e ensaios preliminares
para clonagem em vetor viral**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Galli

Pelotas, 2019

Ficha Catalográfica

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G558c Glenzel, Vitória Hirdes

Caracterização *in silico* dos genes *VfDGATs* e *VfFADs* e ensaios preliminares para clonagem em vetor viral / Vitória Hirdes Glenzel ; Vanessa Galli, orientadora. — Pelotas, 2019.

69 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Tungue. 2. Metabolismo lipídico. 3. *VfDGAT2*. 4. *VfFADX*. 5. Expressão transiente. I. Galli, Vanessa, orient. II. Título.

CDD : 620.8

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Vitória Hirdes Glenzel

Caracterização *in silico* dos genes *VfDGATs* e *VfFADs* e ensaios preliminares para clonagem em vetor viral

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: 28 de novembro de 2019

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Vanessa Galli (Orientadora)
Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Soares Chaves
Doutora em Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale pelo Institut National Polytechnique de Toulouse
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Me. Rosane Lopes Crizel
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Me. Rafaela Silva Formoso
Mestre em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas

À minha família, em especial minha irmã Iohana, e a todas as mulheres que se propõem a fazer ciência, dedico.

Agradecimentos

Me mostro grata a Deus, à vida, ao universo, enfim, pela oportunidade de estar finalizando este trabalho, e com ele mais uma etapa da minha vida, a graduação! Pela força que recebi mesmo quando a exaustão se fazia presente. E por todas as pessoas aos quais sou muito grata de ter em minha vida, onde sem elas, muito deste trabalho não seria possível.

Sendo assim, gostaria de começar agradecendo a minha família, minha irmãzinha Iohana, sempre tão amorosa, me fazendo rir, me mostrando que vale a pena continuar lutando sempre, depois que eu tive você, nunca mais me senti sozinha, e farei tudo por ti, você é a melhor irmã que alguém poderia ter. Minha mãe Jane e meu pai Edson, que sempre estiveram do meu lado, me deram apoio emocional e financeiro durante toda minha vida escolar e durante os 4 anos de faculdade, para que eu pudesse concluir a graduação. Vocês são minha inspiração de força, amor, e recomeço. Se sou o que sou hoje, devo a vocês, exemplos de caráter justo, ético, que sempre me ensinaram o caminho do bem, sempre me ensinaram que a humildade e a gentileza são leis. Obrigada, eu amo muito vocês.

Gostaria de agradecer ao meu namorado Regis, meu amor, minha inspiração para a cada dia ser melhor como ser humano e como profissional. Obrigada por estar ao meu lado quando tudo desmoronou e por ajudar a me reerguer dia após dia, por estar ao meu lado nesses 6 anos, me amando apesar de tudo e acima de tudo. Me faltam palavras para agradecer por ti ter na minha vida e por tudo que tu representa. Tu é um dos meus exemplos de determinação, foco, e caráter. Eu te amo muito! Para sempre!

Gostaria de agradecer aos demais familiares, como tios, tias, avós, em especial minha prima Acsa, eu amo muito você, a todos os demais queridos primos, e em especial aos meus queridos sogros, It e Ivan, que sempre estiveram presente, dando uma palavra amiga e demonstrando preocupação comigo e meus estudos.

Gostaria de agradecer imensamente aos colegas (tanto de aula como da Biotecnologia) aos quais eu tive a honra de conhecer e conviver nesses 4 anos! Felizmente são muitos, e não terei como citar o nome de todos, mas cada um deixou sua marca em mim. Porém gostaria de citar o grupo “panela da panela”, que foram grandes amigos, demonstrando sempre apoio, do qual eu recebi muito amor, carinho e aceitação! Além disso, gostaria de agradecer ao Eduardo Costa, a Giuliana e Izadora, por todo apoio, incentivo, e amor, vocês são exemplos do que é ser um ser humano bom, um amigo leal e uma pessoa íntegra, vocês me inspiram a ser melhor a cada dia. Eu amo vocês!

Gostaria de agradecer aos demais amigos que fiz ao longo da minha trajetória, as meninas do “pipicats da lau” ao qual sou amiga desde criança, e sempre se fizeram presentes em minha vida. Em especial a minha melhor amiga Gabi, que sempre acreditou em mim, mesmo quando eu mesma não acreditei, esteve sempre perto mesmo com a distância física. Obrigada por tanto, eu te amo muito!

Gostaria de agradecer a UFPel, a Pró-Reitoria de Assuntos Estudantis (PRAE) e a Biotecnologia por todo suporte prestado. Agradecer a todo(a)s o(a)s professores (a) que passaram por toda minha vida estudantil e acadêmica, vocês me ensinaram muito, sobre a vida, sobre tudo. Agradecer em especial aos meus dois primeiros orientadores da graduação, a Prof Dr. Fabiana Seixas, e o Prof Dr. Fábio Leivas Leite,

pela oportunidade de estagiar, pelas bolsas e por tantos ensinamentos que se farão úteis em toda minha vida profissional. Muito obrigada.

Agradecer a minha orientadora, a Prof. Dr. Vanessa Galli, primeiramente pela oportunidade que me foi dada, por todo suporte prestado, por ser gentil e atenciosa à todo momento, por se doar tanto ao que faz, seja como orientadora, professora ou pesquisadora. Por me dar apoio e ser compreensiva sempre que precisei. Sem você prof, esse trabalho não seria possível, sua ajuda e palavras me davam incentivo para continuar e ver que tudo daria certo, como você mesmo dizia. Obrigada por ouvir meus áudios longos, e não rir das minhas perguntas bobas (risos). Você é o exemplo de profissional que quero seguir, e um exemplo de pessoa que desejo me tornar. Obrigada por tanto.

Gostaria de agradecer ao grupo de pesquisa em Biotecnologia Vegetal e a todo o GPGV, por terem me acolhido, por serem pessoas tão incríveis, pessoas boas, além de profissionais ímpares. Ainda que por pouco tempo, foram muito bons os momentos que passamos juntos, e vocês sempre vão estar no meu coração e nas minhas lembranças. Em especial gostaria de agradecer aos colegas Pedro Reisser e Gustavo Camozatto, que me ajudaram em etapas deste trabalho, e se fazerem presentes e atenciosos sempre que precisei.

Gostaria de agradecer a Rafaela Formoso por toda ajuda, por passar comigo vários “perrengues”, por se mostrar atenciosa, me dando apoio técnico e literário. Você vai longe Rafa, muito obrigada por tudo!

Por fim, mas não menos importante, é claro, gostaria de agradecer a Rosane Crizel, minha orientadora de estágio, por todo apoio, pelas conversas, pela compreensão, pelo carinho e principalmente pela ajuda e suporte prestados durante toda resolução deste trabalho. Sempre disposta a ajudar da melhor forma possível, sua presença fez meu ano mais leve! Você é um exemplo de pessoa Ro, mas além de tudo, você é um exemplo de profissional! Fiquei muito feliz em ter convivido contigo, nem que por pouco tempo, e aprendido tanto! Você merece o mundo. Obrigada.

Muito obrigada!

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto”

Carl Sagan.

Resumo

GLENZEL, Vitória Hirdes. **Caracterização *in silico* dos genes *VfDGATs* e *VfFADs* e ensaios preliminares para clonagem em vetor viral**. 2019. 69f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) – Curso de Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

Vernicia fordii (tungue) é uma árvore que possui valor agregado devido à alta capacidade secativa que o óleo da mesma contém. Este fato é devido ao óleo de tungue ser composto por 80% do ácido graxo denominado ácido alfa-eleosteárico. Além disso tem sido prospectado para ser utilizado como biodiesel. No entanto, o tungue apresenta baixa produtividade e é de difícil melhoramento. Sendo assim, esforços tem sido feitos para entender melhor o metabolismo lipídico de tungue, no intuito de produzir esse óleo em outras plantas. Dentre as enzimas presentes no metabolismo, dois grupos tem chamado a atenção, são as Diacilglicerol Aciltransferases (DGATs) e as Dessaturases/Conjugases de Ácidos Graxos (FADs). Neste sentido, o objetivo do trabalho foi caracterizar *in silico* os genes *VfDGATs* e *VfFADs*, bem como realizar ensaios preliminares para clonagem dos genes *VfDGAT2* e *VfFADX*, em vetor viral. Como resultados foi possível observar que as enzimas envolvidas no metabolismo lipídico de Euphorbiaceae foram agrupadas filogeneticamente de acordo com sua função e localização subcelular, demonstrando o papel da conservação de genes importantes para determinada especialidade. Foi observado que as enzimas *VfDGATs* e *VfFADs* conservam alguns domínios de funções entre si. Ainda, foi realizada uma análise de expressão *in silico* dos genes *VfDGATs* e *VfFADs* e um interatoma que permite verificar *in silico* interações entre diferentes proteínas. Foi possível a extração de ácidos nucleicos de tungue, tal como a amplificação do gene *VfDGAT2*. Além disso, foi realizada a extração do vetor viral TRBO (do inglês, “*TMV RNA-based overexpression*”) seguido de sua clivagem com a enzima de restrição *AvrII*. No entanto, novas tentativas são necessárias para que seja possível a amplificação do gene *VfFADX*, e clivagem com a enzima de restrição *PacI*. Desta forma, as informações obtidas neste estudo permitiram compreender melhor as funções e relações filogenéticas entre as *VfDAGTs* e *VfFADs*, o que poderão ser utilizadas para o desenvolvimento de estratégias para a produção do óleo de tungue em outras espécies vegetais mais produtivas. Tendo-se como perspectivas futuras, prosseguir com a clonagem dos genes *VfDGAT2* e *VfFADX* em vetor viral para expressão transiente em tabaco.

Palavras-chave: Tungue; Metabolismo lipídico; *VfDGATs* e *VfFADs*; Estudos *in silico*.

Abstract

GLENZEL, Vitória Hirdes. ***In silico* characterization of VfDGATs and VfFADs genes and preliminary assays for viral vector cloning**. 2019. 69f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) – Curso de Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Vernicia fordii (tungue) is a tree that has added value due to the high drying capacity that its oil contains. This is due to the fact that tung oil is composed of 80% of the fatty acid called alpha-elosteic acid. In addition it has been prospected to be used as biodiesel. However, the tung has low productivity and is difficult to enhance. Thus, efforts have been made to better understand the tung lipid metabolism in order to produce this oil in other plants. Among the enzymes present in the metabolism, two groups have drawn called attention, they are the Diacylglycerol Acyltransferases (DGATs) and the Fatty Acid Desaturases / Conjugases (FADs). In this sense, the objective of this work was to characterize the genes *VfDGATs* and *VfFADs* in silico, as well as to carry out preliminary assays for cloning the *VfDGAT2* and *VfFADX* genes in viral vector. As results it was observed that the enzymes involved in the lipid metabolism of Euphorbiaceae were phylogenetically grouped according to their function and subcellular localization, demonstrating the role of the conservation of important genes for a particular specialty. It was observed that the enzymes *VfDGATs* and *VfFADs* retain some function domains with each other. In addition, an in silico expression analysis of the *VfDGATs* and *VfFADs* genes was performed and an interatoma that allows to verify in silico interactions between different proteins. It was possible to extract tung nucleic acids, such as well as amplification of the *VfDGAT2* gene. In addition, the TRBO viral vector (TMV RNA-based overexpression) was extracted followed by its cleavage with the restriction enzyme AvrII. However, further attempts are needed to enable the amplification of the *VfFADX* gene, and cleavage with the PaeI restriction enzyme. Therefore, the information obtained in this study allowed a better understanding of the the phylogenetic functions and relationships between *VfDAGTs* and *VfFADs*, which can be used to develop strategies for tung oil production in other more productive plant species. As future perspectives, continue cloning the *VfDGAT2* and *VfFADX* genes into viral vector for transient tobacco expression.

Key-words: Tung; Lipidic metabolism; *VfDGATs* and *VfFADs*; *In silic* studies.

Lista de Figuras

Figura 1:	Árvore de tungue em época de floração.	22
Figura 2:	Flores de tungue.	22
Figura 3:	Folhas e frutos de tungue em estágio de amadurecimento.	23
Figura 4:	Frutos e sementes de tungue.	23
Figura 5:	Rota metabólica de lipídeos em plantas.	27
Figura 6:	Estrutura do ácido alfa-eleosteárico.	28
Figura 7:	Mapa do vetor viral de pJL-TRBO	37
Figura 8:	Ferramenta Clustal Omega utilizada no alinhamento de sequências.	45
Figura 9:	Exemplificação dos dados que são gerados na ferramenta de alinhamento.	46
Figura 10:	Demonstração da ferramenta ORFinder (NCBI).	47
Figura 11:	Árvore filogenética das DGATs de tungue (<i>Vf</i>), mamona (<i>Rc</i>) e pinhão-manso (<i>Jc</i>), com os valores de confiabilidade descritos.	48
Figura 12:	Árvore filogenética das FADs de tungue (<i>Vf</i>), mamona (<i>Rc</i>) e pinhão-manso (<i>Jc</i>), com os valores de confiabilidade descritos.	49
Figura 13:	Motivos conservados encontrados nas sequências das enzimas DGATs de tungue.	51
Figura 14:	Motivos conservados encontrados nas sequências das enzimas FADs de tungue.	51
Figura 15:	<i>Heat Map</i> das sequências de DGATs de tungue.	53
Figura 16:	<i>Heat Map</i> das sequências de FADs de tungue.	53
Figura 17:	Legenda obtida da ferramenta STRING, que demonstra o que cada cor significa no mapa.	54

Figura 18:	Resultado do interatoma realizado com a proteína DGAT1.	55
Figura 19:	Resultado do interatoma realizado com a proteína DGAT2.	56
Figura 20:	Resultado do interatoma realizado com a proteína FAD2.	57
Figura 21:	Demonstração dos <i>primers forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) de <i>VfDGAT2</i> e as sequências das enzimas de restrição <i>AvrII</i> e <i>PacI</i> nas extremidades.	57
Figura 22:	Demonstração dos <i>primers</i> F e R de <i>VfFADX</i> e as sequências das enzimas de restrição <i>AvrII</i> e <i>PacI</i> nas extremidades.	58
Figura 23:	Demonstração do vetor viral TRBO+ <i>VfDGAT2</i> .	59
Figura 24:	Demonstração do vetor viral TRBO+ <i>VfFADX</i> .	59
Figura 25:	Gel de eletroforese demonstrando a extração de DNA de tungue. As duas bandas representam duplicatas da extração.	61
Figura 26:	Gel de eletroforese demonstrando o resultado da amplificação por PCR dos genes <i>VfDGAT2</i> e <i>VfFADX</i> , onde 1: marcador de peso molecular; 2: <i>VfFADX</i> ; 3: <i>VfDGAT2</i> ; 4: Controle ubiquitina	62
Figura 27:	A: Gel de eletroforese demonstrando a extração do vetor TRBO na conformação de 1 banda indicada com a seta. B: Gel de eletroforese demonstrando a extração do vetor TRBO na conformação de 2 bandas indicadas com a seta.	63
Figura 28:	Gel de eletroforese demonstrando a digestão enzimática do vetor TRBO com a enzima de restrição <i>AvrII</i> . Onde, 1: controle da reação, contendo somente o vetor e o tampão utilizado para a enzima, sem ser feita a digestão enzimática; 2: vetor após a digestão enzimática.	64

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Dados das sequências de <i>VfDGATs</i> de tungue	47
Tabela 2:	Dados das sequências de <i>VfFADs</i> de tungue	48
Tabela 3:	Sequências de <i>primers</i> dos genes <i>VfDGAT2</i> e <i>VfFADX</i>	58

Lista de Abreviaturas e Siglas

α -ESA	Ácido alfa-eleosteárico
DGAT	Diacilglicerol aciltransferase
FAD	Dessaturase de ácido graxo
RNA	Ácido ribonucléico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
mRNAseq	Sequência de Ácido ribonucléico mensageiro
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
TAG	Triacilglicerol
DAG	Diacilglicerol
AG	Ácido graxos
ORF	Fase de leitura aberta (<i>Open read frame</i>)
a.C.	Antes de Cristo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
TMV	Vírus do mosaico do tabaco
TRBO	<i>TMV RNA-based overexpression</i>
GEO	<i>Gene expression omnibus</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
LB	Luria Bertani
<i>Vf</i>	<i>Vernicia fordii</i>
<i>Rc</i>	<i>Ricinus communis</i>
<i>Jc</i>	<i>Jatropha curcas</i>
CRB	Citocromo b5 redutase
ACP	Proteína transportadora de Acil
HAD	Hidroxiacil ACP desidratase
EAR	Enoil ACP redutase
KAS	Cetoacil sintase
KAR	3 Cetoacil-ACP redutase
SAD	ACP estearoil dessaturase
MAT	Malonil-CoA aciltransferase
PDAT	Fosfolípido diacilglicerol aciltransferase
NIA	Nitrato redutase
ACCase	Acetil-CoA carboxilase
PAP	Ácido fosfatídico fosfatase
β CT	Subunidade beta da carboxil transferase
α CT	Subunidade alfa da carboxil transferase

BCCP	Proteína transportadora de biotina ca	ila
BC	Biotina carboxilase	
G3PAT	Glicerol 3-fosfato aciltransferase	
LPAT	Ácido lisofosfatídico aciltransferase	
TE	Tampão de eluição	
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético	
pH	Potencial hidrogenônico	
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e	
	Instatística	
FAO	Food Agriculture Organization	
RE	Retículo endoplasmático	
aa	Aminoácido	

Sumário

1 Introdução geral	18
2 Objetivo	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 Revisão bibliográfica	21
3.1 Tungue (<i>Vernicia fordii</i>)	21
3.2 Metabolismo lipídico de plantas	24
3.2.1 Regulação do acúmulo de ácido alfa-eleosteárico no óleo de tungue através das enzimas DGAT2 e FADX.....	27
3.3 Tentativas de produção de ácidos graxos conjugados de tungue em outros organismos.....	30
3.4 A importância da bioinformática para análises <i>in silico</i>	33
3.5 Utilização de vetores virais para expressão heteróloga de proteínas em plantas	34
4 Materiais e Métodos	38
4.1 Análises <i>In silico</i>	38
4.1.1 Alinhamento de sequências e análise filogenética	38
4.1.2 <i>Heat Map</i>	38
4.1.3 Interatoma	39
4.1.4 Análises de motivos	40
4.2 Desenho de primers e Construção do vetor (<i>in silico</i>).....	40
4.3 Extração de ácidos nucleicos, síntese de cDNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	41
4.4 Construção do vetor de clonagem (<i>in vitro</i>).....	42
5 Resultados e Discussão	44
5.1 Análises <i>In silico</i>	44
5.1.1 Identificação e estrutura dos genes <i>VfDAGTs</i> e <i>VfFADs</i> e análises filogenéticas	44
5.1.2 Análises de expressão <i>in silico</i>	51

5.1.4 Análise de interatoma	
5.2 Clonagem dos genes <i>VfDGAT2</i> e <i>VfFADX</i> em vetor viral.....	
6 Conclusões e perspectivas	65
7 Referências	66

1 Introdução geral

O tungue (*Vernicia fordii*), espécie da família Euphorbiaceae, é proveniente da China, onde começou a ser cultivado com o objetivo de produção de combustível. Ao longo dos anos, foi introduzido em outros países, incluindo o Brasil, devido às características comerciais favoráveis relacionadas ao conteúdo oleaginoso que essa planta possui (SILVA et al., 2013) (SHOCKEY, 2016). O óleo de tungue é produzido e armazenado em suas sementes, em concentrações que chegam a 60% da massa fresca, e tem sido atualmente utilizado como componente importante em produtos de alto valor agregado, como vernizes, tintas, resinas, corantes e etc (VANHERCKE et al., 2013). Isso porque o óleo de tungue possui em sua composição cerca de 75-80% de um ácido graxo, denominado ácido-alfa eleosteárico (α -ESA) ou ácido octadeca-9,11,13-trienoico que é facilmente oxidado, conferindo capacidade secativa ao óleo (SHOCKEY, 2016).

A China é responsável por pelo menos 70% da produção do óleo de tungue mundial. No Brasil, mais especificamente no estado do Rio Grande do Sul, a produção de sementes foi de 264 toneladas no ano de 2013 (SHOCKEY et al., 2016). No mesmo ano, a produção de fruto seco por hectare foi de cerca de 2933 kg, segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Já em 2018, estimou-se que o estado foi responsável pela produção de 314 toneladas de fruto seco, contabilizando 100% da produção nacional de tungue. Os maiores produtores são os municípios de Fagundes Varela, Coqueiro Baixo, Veranópolis e Cotiporã, todos localizados na serra Gaúcha (IBGE, 2018).

Apesar da expansão da cultura pelo mundo, a principal problemática acerca da árvore de tungue é ainda seu baixo rendimento de frutos e características agrônômicas desfavoráveis (BROWN & KEELER, 2005). Sendo assim, esforços para melhorar a produção de óleo tem sido realizados, especialmente em países onde a técnica de extração já é consolidada, como a China e Paraguai, este último que ocupa o segundo lugar no ranking de produção de sementes de tungue (FAO, 2013). Porém,

as características agrônomo-fisiológicas da cultura dificultam cruzamentos e melhoramentos convencionais, tornando-se necessárias novas abordagens para melhorar a produtividade da árvore de tungue.

Além disso, com avanços em estudos sobre a fisiologia, biologia molecular e bioquímica do tungue, alguns pesquisadores tem direcionado seus esforços na transferência de genes, que codificam para as proteínas responsáveis pela biossíntese de ácido α -eleosteárico, para plantas com maior rendimento, que possuam características agrônomicas bem consolidadas, e sejam de fácil manejo e produção (VANHERCKE et al., 2013; SHOCKEY et al., 2016), a exemplo do tabaco (*Nicotiana tabacum*). O tabaco possui características agrônomicas favoráveis, como bom rendimento, estabilidade entre cultivos, não se trata de uma cultura alimentícia, podendo ser feito o manejo integrado com outras culturas como milho e feijão, e possui também significativa área foliar em comparação com outras culturas (HEEMANN, 2009). Além disso, técnicas de transformação genética estão bem estabelecidas para esta cultura (ANDRIANOV et al., 2010). No entanto, é necessário que se conheça bem o metabolismo lipídico envolvido na produção do óleo de tungue, assim como os genes que codificam para as enzimas envolvidas nos momentos de maior acúmulo de óleo, para que as chances de sucesso sejam aumentadas.

Neste contexto, alguns estudos tem abordado o papel de enzimas que estão relacionadas ao acúmulo de óleo nas sementes de tungue, dos quais, duas tem despertado a atenção. São elas as Diacilglicerol aciltransferases (DGATs); do inglês, *diacylglycerol acyl transferase* (EC 2.3.1.20), e as Dessaturases de ácido graxo (FADs); do inglês, *fatty acid desaturase* (EC 1.14.19.1) (GALLI et al. 2014). As enzimas DGAT catalisam a etapa final de acilação na via de biossíntese dos triacilgliceróis (TAGs), transferindo um grupamento Acil, de Acil-CoA, para a posição 3 do diacilglicerol, formando o TAG (DYER et al. 2008). Já as enzimas FADs são responsáveis por incluir insaturações e/ou conjugações nos ácidos graxos que constituem os TAGs.

Portanto, neste trabalho, buscou-se entender, através de análises *in silico*, o papel das DGATs e FADs no metabolismo de tungue. Além disso, buscou-se, clonar os genes que codificam para *VfDGATs* e *VfFADs*, que se mostrassem mais relevantes para a síntese de ácido α -eleosteárico, em um vetor viral de expressão, para que futuramente pudessem ser utilizados na produção deste ácido graxo de tungue em

folhas de tabaco. Ao longo deste trabalho, serão melhor elucidadas as técnicas utilizadas para realização do mesmo, assim como as análises utilizadas e os métodos empregados.

2 Objetivo

2.1 Objetivo geral

Caracterizar *in silico* os genes *VfDGATs* e *VfFADs*, bem como realizar ensaios preliminares para clonagem dos genes *VfDGAT2* e *VfFADX*, em vetor viral.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a triagem através de alinhamentos de *contigs* de mRNAs que codificam para DGATs e FADs provenientes de bancos de mRNAseq já descritos anteriormente, oriundos de sequenciamento de frutos maduros de tungue;
- Determinar a região codificadora (ORF, do inglês, *open reading frame*) das sequências identificadas;
- Realizar análises de genômica estrutural comparativa entre as sequências identificadas com as de outras espécies da família Euphorbiaceae;
- Analisar a expressão *in silico* de *VfDGATs* e *VfFADs* em frutos maduros de tungue;
- Desenhar os *primers* para amplificação dos genes *VfDGAT2* e *VfFADX*, visando sua clonagem;
- Simular *in silico* o vetor viral TRBO com as sequências dos genes de interesse;
- Amplificar os genes *VfDGAT2* e *VfFADX*;
- Realizar a restrição enzimática no vetor e no inserto para posterior montagem *in vitro* das sequências.

3 Revisão bibliográfica

3.1 Tungue (*Vernicia fordii*)

A árvore de tungue, ou simplesmente tungue, é um planta milenar que começou a ser cultivada e utilizada comercialmente pela China, e é possível encontrarmos registros de sua utilização em escrituras de Confúcio à 400 anos a.C. Na China, o óleo de tungue tem sido utilizado a diversos anos para impermeabilização de alvenaria, tecidos, calçados, roupas e papel. Além disso, o óleo misturado com argamassa de cal ou resíduo de tungue queimado foi um dos primeiros agentes do mundo para impermeabilização e calafetagem de barcos (BROWN & KEELER, 2005). No Brasil, o tungue começou a ser introduzido no início do século XX pela empresa de Tintas Renner® (ALMEIDA et al., 2012; SILVA et al., 2013).

O tungue é uma árvore caducifólia, de ciclo de vida perene, e clima subtropical, pertencente à família Euphorbiaceae. Apresenta como características físicas uma altura de cerca de 12 metros, com casca lisa, madeira macia, e folhas verdes escuras em formato de coração, de onde deriva o nome “tung” (do chinês, “coração”) (Figura 1 e 3). Suas flores são de tonalidades brancas e rosadas, se apresentam em forma de cachos e são produzidas logo no início da primavera (Figura 2). A reprodução do tungue se apresenta de forma monóica, isto é, as árvores possuem flores femininas e masculinas, sendo, geralmente, flores pistiladas rodeadas por várias flores estaminadas, em uma proporção média de uma flor estaminada a cada 20 flores. Já como características dos frutos de tungue, podemos citar que estes são esféricos, tendo em média 1 a 2,5 centímetros de comprimento, variando de cor verde a roxo escuro à medida que amadurecem, e possuem um envoltório duro, onde cada fruto possui comumente 5 sementes, podendo variar de 3 a 7 (Figura 4) (BLACKMON, 1943) (BROWN & KELLER, 2005).



Figura 1: Árvore de tungue em época de floração (Lanzetta, Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2014).

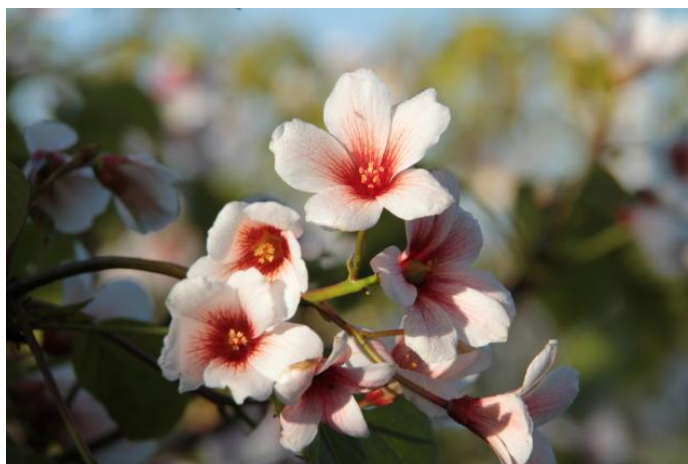


Figura 2: Flores de tungue (Lanzetta, Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2014).



Figura 3: Folhas e frutos de tungue em estágio de amadurecimento (Biodiesel Brasil, acesso em novembro de 2019).



Figura 4: Frutos e sementes de tungue (Wood Works, acesso em novembro de 2019).

Quanto à produção, o tungue pode produzir frutos somente uma vez ao ano, nos meses que contemplam o verão, o que resulta na produção de cerca de 2.000 kg por hectare de óleo (DUKE, 1983). Já se tratando do rendimento do óleo de tungue, esse representa cerca de 50% do peso da amêndoa e 20% do peso do fruto (CARELS, 2009). Ao caírem no chão, os frutos são deixados por algumas semanas para secar e curar; a seguir as nozes são separadas da casca e pressionadas para extração de óleo (BROWN e KELLER, 2005).

Quanto a suas características fisiológicas, o tungue possui algumas vantagens, como um sistema radicular profundo e pivotante, com crescimento de raízes laterais, que é capaz de tolerar curtos períodos de estiagem sem comprometer de forma significativa a produção de frutos. Devido a isso, é que prefere solos bem drenados, com arejamento e alta capacidade de retenção de umidade (BLACKMON, 1943; BROWN e KELLER, 2005). Necessita de aproximadamente 350 a 400 horas de frio (abaixo de 7,2 °C), para que ocorra a quebra de dormência e estímulo a floração. Assim se torna possível a diferenciação do florescimento e a frutificação. Entretanto, geadas tardias podem afetar a produção de flores e frutos quando atingem esses tecidos, que são frágeis em início de formação, o que pode conferir um problema frente a produtividade da planta (ALMEIDA et al., 2012).

O tungue vem sendo utilizado a diversos anos devido a qualidade secativa que seu óleo atribui a tintas, vernizes, epóxis, entre outros produtos. Inicialmente foi pensado também para utilização como biodiesel, por ser uma cultura oleaginosa não alimentícia (SHOCKEY, 2016). Estudos tem sido feitos para melhorar as atribuições do óleo de tungue para esta finalidade. Entretanto, a respeito da cultura, outros esforços são necessários para padronizar e assim melhorar a produção de sementes de tungue para utilização do óleo, seja para uso como biodiesel ou na formulação de

outros produtos (VANHERCKE et al., 2013). Estudos científicos a respeito da cultura do tungue no Brasil ainda são escassos, quando comparamos com outras culturas. A produção científica começou a aumentar a partir de 2006, devido a busca por novas plantas oleaginosas (ALMEIDA, 2012). O tungue é uma cultura exigente quando se tratando de condições climáticas, necessitando de condições específicas para que se obtenha uma produção significativa. Exigindo verões longos e úmidos, e em contrapartida invernos amenos, não tão rigorosos e nem tão quentes. Além disso, apresenta algumas características pouco favoráveis, como baixo número de flores fêmeas (apenas uma dentre 20 flores), que diminuem a chance de polinização e conseqüentemente o número de frutos. Possui baixa padronização no tamanho e formato dos frutos (BROWN & KEELER et al., 2005). Contudo, a principal problemática se encontra no tempo de geração de frutos. A produção do tungue é iniciada somente no terceiro ano após o plantio, estabilizando a produção no quarto ou quinto ano e alcançando sua máxima produção somente em 10-12 anos (DUKE, 1983). Devido a isso e à crescente demanda por óleos vegetais, a saída de óleo de tungue não tem sido capaz de satisfazer as exigências do mercado internacional (ALMEIDA et al., 2012).

Sendo assim, se faz necessária a busca por estratégias de melhorar a produção da árvore de tungue, tal como novas alternativas para obtenção de óleo do mesmo. Com isso, pode-se destacar a produção do óleo em outras plantas, através de técnicas de biotecnologia e engenharia genética.

3.2 Metabolismo lipídico de plantas

A síntese de lipídeos em plantas é um processo sofisticado, que envolve diversas etapas enzimáticas. Ao contrário de outros organismos, onde a síntese ocorre no citosol, em plantas ela inicia nos plastídeos. Além disso, os lipídeos em plantas são sintetizadas na forma de Triacilgliceróis (TAGs), que se apresentam como ésteres compostos por três ácidos graxos (AG) ligados ao glicerol (1,2,3-propanotriol). Esses lipídeos se acumulam em micelas no citosol, chamados de oleossomos, e quando necessário são levados aos peroxissomos para degradação, o que tem como vantagem não causar um aumento na osmolaridade celular, porém também podem ser encontrados em outros compartimentos celulares, como nos cloroplastos, fator induzido por questões ambientais. As funções dos TAGs nos vegetais vão de reserva

energética e de carbono, constituintes dos tecidos como da própria parede celular e energia para o crescimento pós-germinativo. Já nas folhas atuam como reserva transitória para AGs envolvidos na remodelação da membrana, sinalização lipídica e/ou renovação de ácidos graxos (XU & SHANKLIN, 2016; MANAN et al., 2017).

Quanto aos ácidos graxos, esses são divididos em dois grupos: insaturados e saturados. Os AG insaturados são aqueles que possuem uma ou mais ligações duplas em suas cadeias carbônicas, e os saturados, são aqueles que não possuem ligações duplas carbono-carbono (CHRISTIE, 1986). Além disso, pode-se encontrar alguns grupos funcionais nos AGs que conferem funções específicas na sua formação e função, como hidroxilas, epóxi, acetil, entre outros (DURRETT; BENNING; OHLROGGE, 2008). Os principais AGs presentes nos óleos vegetais são os ácidos palmítico (16:00), esteárico (18:00), oléico (18:01), linoléico (18:02) e linolênico (18:03) (DURRETT; BENNING; OHLROGGE, 2008).

Podemos descrever a síntese de TAGs nas plantas em três principais etapas, que ocorrem preferencialmente através de uma via dependente de Acil-CoA, onde o mesmo é utilizado na incorporação de três grupamentos acil ao glicerol, catalisada pelas enzimas glicerol 3-fosfato aciltransferase (G3PAT, EC 2.3.1.15), ácido lisofosfatídico aciltransferase (LPAT) e fosfatídico fosfatase (PAP, EC 3.1.3.4). A via é chamada Via de Kennedy, e as etapas subsequentes são: a) biossíntese de AGs nos cloroplastos; (b) ativação e transporte dos AGs ao retículo endoplasmático; e por fim (c) síntese de TAGs (Figura 5) (LI-BEISSON et al., 2013; MANAN et al., 2017).

Inicialmente, ocorre a conversão do acetil-CoA em malonil-CoA, pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACCCase, EC 6.4.1.2). A ACCCase se apresenta de duas formas em plantas superiores: ACCCase homomérica e heteromérica. A reação de carboxilação é realizada pela forma heteromérica da ACCCase, que possui quatro subunidades: uma subunidade codificada no plastídeo, a subunidade β da carboxil transferase (β CT), e três subunidades codificadas no núcleo, denominadas proteína transportadora de biotina carboxila (BCCP, EC 2.1.3.15), biotina carboxilase (BC) e subunidade α -carboxil transferase (α -CT) (LI-BEISSON et al., 2013). Se tratando do tungue, estudos demonstraram que a BCCP, tem maiores níveis de expressão nos estádios finais de amadurecimento dos frutos, momento que coincide com maiores níveis de produção de óleo. Além disso, foi descrito que o gene que codifica para a

enzima homomérica ACCase também possui um aumento em sua expressão à medida que os frutos amadurecem (GALLI et al., 2014).

Após a formação do malonil-CoA, a enzima malonil-CoA aciltransferase (MAT) catalisa a reação de condensação do malonil-CoA com o auxílio da proteína transportadora de acil (ACP, EC 2.7.8.7), formando malonil-ACP. Após isso, deve ocorrer a formação de um ácido graxo de 18 carbonos que é catalisada por uma série de reações. Dentre elas podemos citar sete ciclos de reações de condensação, redução e desidratação realizados pelas enzimas SIII e I (KAS III, EC 2.3.1.180 e KAS I, EC 2.3.1.41), 3-cetoacil-ACP redutase (KAR, EC 1.1.1.96), hidroxiacil-ACP desidratase (HAD) e enoil-ACP redutase (EAR). O cetoacil-ACP gerado sofre seis adições consecutivas de carbono pela enzima KASI, o que resulta na formação de um ácido graxo de 16 carbonos, ligado a ACP, o palmitoil-ACP. O alongamento final decorrente do palmitoil-ACP (16 carbonos) ao estearoil-ACP (18 carbonos) é catalisado pela enzima KASII (EC 2.3.1.179) (LI-BEISSON et al. 2013).

Já no retículo endoplasmático, o primeiro passo que ocorre para formação do TAG é a conversão do diacilglicerol (DAG). As enzimas diacilglicerol aciltransferase (DGATs) e fosfolipídio diacilglicerol aciltransferase (PDAT, EC 2.3.1.158) 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 (NELSON e COX, 2017). A formação de ácidos graxos insaturados, ocorre pela ação de enzimas dessaturases (FADs). Essas enzimas removem dois hidrogênios e geram uma insaturação nos DAGs (MANAN et al., 2017). As reações ocorrem a partir do 18:00 estearoil-ACP, que é dessaturado em 18:01 oleoil-ACP, por meio de uma enzima denominada ACP estearoil dessaturase (SAD, EC 1.14.99.6). A seguir, novas insaturações ocorrem para geração de outros ácidos graxos, como o 18:02 linoleico-ACP e 18:03 linolênico-ACP. As reações são catalisadas pelas enzimas Δ 12-dessaturase (FAD2, EC 1.3.1.35) e ω 3- dessaturase (FAD3, EC 1.14.19.25), respectivamente (SHOCKEY et al., 2016) (Figura 5).

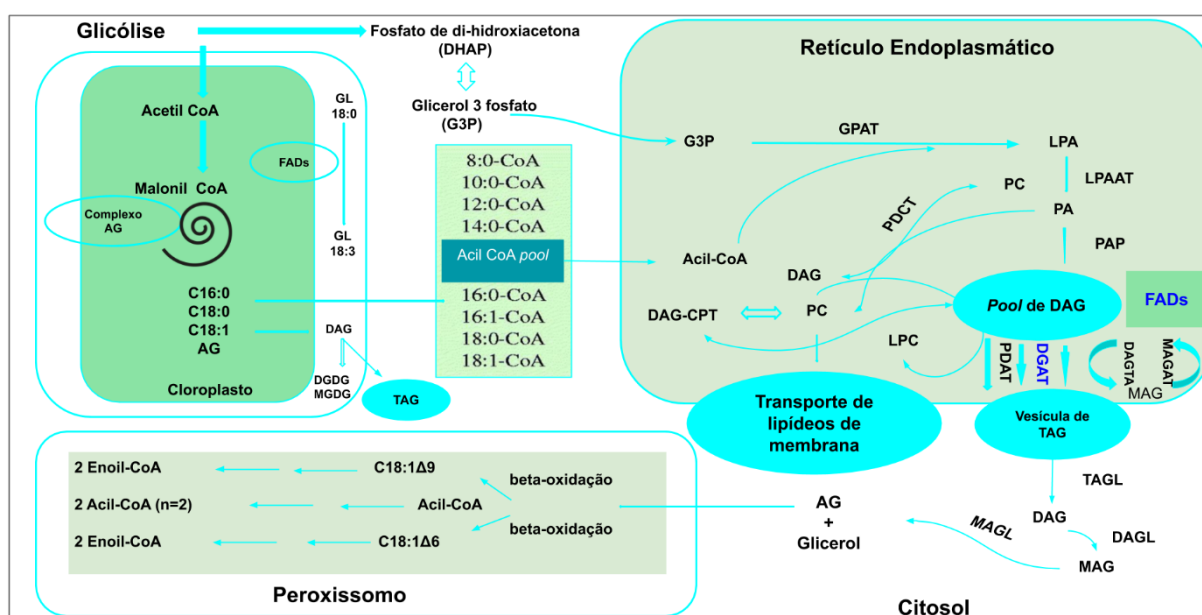


Figura 5: Rota metabólica de lipídeos em plantas. TAG: triacilgliceril; AG: ácido Graxo; DAG: diacilglicerol; GL: galactoglicerolipídeos; GPAT: glicerol-3-fosfato aciltransferase; PDAT: fosfolipídeo diacilglicerol aciltransferase; PDCT: fosfatidilcolina transferase; DGAT: diacilglicerol aciltransferase; LPA: ácido lisofosfatídico; LPAAT: ácido lisofosfatídico acil transferase; PC: fosfatidilcolina; PA: ácido fosfatídico; PAP: ácido fosfatídico fosfatase; CPT: colina fosfotransferase; LPC: ácido fosfatidilcolina; MAG: monoacilglicerol; MAGL: monoacilglicerol lipase; DAGL: diacilglicerol lipase; TAGL: triacilglicerol lipase; FADs: dessaturases de ácidos graxos. (Manan et al., 2017 adaptado).

3.2.1 Regulação do acúmulo de ácido alfa-eleosteárico no óleo de tungue através das enzimas DGAT2 e FADX

O ácido alfa-eleosteárico (α -ESA), presente no óleo de tungue, é um ácido graxo conjugado trienólico, que corresponde a cerca de 80% do conteúdo de ácidos graxos presentes nestas sementes (SMITH, 1971; PARK et al., 2008). Sendo assim, o óleo de tungue possui uma quantidade reduzida em outros ácidos graxos usuais, como palmitato, estearato, oleato, linoleato e linolenato. Já foi relatada a presença do α -ESA em outras espécies vegetais, como o melão chinês (*Momordica charantia*). No entanto, no tungue é onde são encontradas as maiores e mais puras concentrações do α -ESA (SHOCKEY, 2016). Sua conformação tem chamado atenção devido às características secativas que o α -ESA confere ao óleo de tungue, e vem sendo usado pela indústria desde então. Diversos estudos relataram diferentes utilizações para o óleo de tungue, como sua presença em resinas de poliéster e epóxis, o que mantém

a qualidade desses materiais, diminuindo a quantidade de materiais de origem fóssil ou tóxicos no caso do epoxi (DAS et al., 2011; HUANG et al., 2014). Além disso, devido a crescente busca por combustíveis de origem renovável, preferencialmente provenientes de culturas não alimentícias, o tungue também chamou atenção dos pesquisadores. No entanto, para um biodiesel ideal, são preferíveis AGs monoinsaturados, pois esses possuem maior estabilidade oxidativa, diferente do α -ESA de tungue (DURRETT; BENNING; OHLROGGE, 2008). Sendo assim, para uso como biodiesel seria necessário que o conteúdo do mesmo fosse diminuído.

O α -ESA se caracteriza bioquimicamente como 18:3 Δ 9cis, 11 trans, 13 trans (Figura 6). Este, possui uma reatividade exclusiva, que possibilita sua participação em uma variedade de reações químicas, como reações ácido-base, de esterificação, de redução, de polimerização térmica, reações de Diels-Alder e também adição de duplas ligações carbono-carbono (DAS et al., 2011).

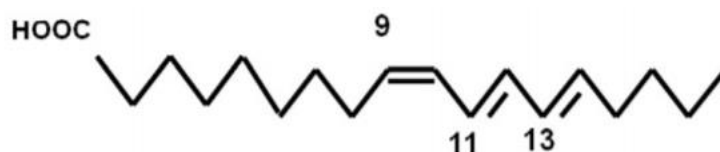


Figura 6: Estrutura do α -ESA (SHOCKEY 2016).

Diversos estudos têm abordado o papel de enzimas que estão relacionadas à síntese e ao acúmulo de óleo nas sementes de tungue, e, mais especificamente, à de α -ESA. Duas enzimas têm despertado a atenção por estarem intimamente ligadas ao acúmulo de óleo em tungue, a *VfDGAT2* e a *VfFADX* (GALLI et al. 2014).

A enzima DGAT2 pertence às já mencionadas DGATs. Até o momento, três DGATs têm sido reportadas em tungue: DGAT1, DGAT2 e DGAT3 solúvel. De acordo com Shockey et al. (2006), a expressão do gene *VfDGAT2* em células de levedura resultou em um acúmulo elevado de TAGs em comparação com o *VfDGAT1*. Além disso, foi demonstrado que a enzima DGAT2 incorpora preferencialmente ácidos graxos incomuns como o ácido α -eleosteárico em TAGs, diferente da DGAT1, que incorpora AGs usuais, como oleato e palmitato (KROON et al. 2006). Vale mencionar, que o *VfDGAT2* é expresso em níveis baixos em outros tecidos do tungue, com exceção do fruto, onde essa expressão é acentuada, principalmente nos estágios de

maior amadurecimento do mesmo (GALLI et al., 2014). O *VfDGAT1* por outro lado, é expresso em níveis basais em todos os tecidos, e não demonstra aumento significativo de sua expressão durante o desenvolvimento das sementes de tungue (SHOCKEY et al., 2006; GALLI et al., 2014). Sendo assim, a enzima DGAT2 de tungue demonstra desempenhar um papel importante na determinação do teor de óleo e, conseqüentemente, da incorporação de α -ESA ao óleo de tungue.

A enzima FADX é responsável por transformar o ácido linoleico em α -ESA, introduzindo a ligação na posição trans, e não cis como ocorre com outras dessaturases. Esta apresenta cerca de 73% de similaridade de aminoácidos com a FAD2, outra dessaturase. Assim como o *VfDGAT2*, o gene *VfFADX* apresenta um aumento de sua expressão nos estágios mais avançados de amadurecimento dos frutos de tungue, e foi demonstrado também que este só é expresso em frutos, não sendo expresso em nenhum outro tecido da planta (SHOCKEY, 2016). A FADX também demonstrou em outros estudos possuir boa plasticidade enzimática, por ser capaz de gerar uma variedade de produtos alternativos de ácidos graxos conjugados e dessaturados na presença de substratos exógenos (DYER et al. 2002). Além disso, um estudo filogenético comparando a FADX de tungue com outras enzimas que tem o papel de modificadores de lipídeos (dessaturase, hidroxilase, epoxigenase, acetilenase e conjugase) revelou várias posições de aminoácidos próximos ao local ativo que podem ser fatores importantes na determinação da atividade enzimática (DYER et al., 2002). th

Visto isso, estudos prévios já haviam demonstrado que estes dois genes aumentam sua expressão durante o desenvolvimento do fruto, atingindo os maiores valores nas sementes de frutos maduros (GALLI et al. 2014). Em conjunto, estes resultados demonstram que o papel dessas enzimas está intimamente ligado ao acúmulo de óleo nos frutos maduros.

Considerando então a importância dos dois genes citados para o acúmulo de óleo e síntese de α -ESA, estudos relacionados à compreensão de como são regulados e o que determina sua especificidade de atuação em relação a outras FADs e DGATs são de extrema importância. Neste contexto, comparar as sequências nucleotídicas e/ou aminoacídicas de FADs e DGATs entre diferentes espécies com conteúdos distintos de ácidos graxos, utilizando de ferramentas de bioinformática pode fornecer informações relevantes. Como foi observado por REN et al. (2013), ao

analisar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em 38 acessos de tungue, reportou a presença de dois SNPs em uma sequência de 1,2 kb do gene *VfFAD2*, por exemplo, os quais foram associados a maiores níveis de α -ESA (REN et al., 2013).

Estes resultados indicam que além de uma gama de enzimas envolvidas no processo de síntese e acúmulo de α -ESA em tungue, estes processos também podem ser dependentes de divergência nas sequências e nos mecanismos de regulação da transcrição dos genes que codificam para estas enzimas.

3.3 Tentativas de produção de ácidos graxos conjugados de tungue em outros organismos

Uma vez que a produtividade do tungue é limitada, esforços para a transferência de genes do mesmo, que codificam para as proteínas responsáveis pela biossíntese de α -ESA, para plantas com maior rendimento tem sido alvos de estudos. Um dos primeiros relatos que se tem na literatura procede de uma abordagem de estudo, com o objetivo de identificar todos os componentes envolvidos na biossíntese e acúmulo de α -ESA nas sementes de tungue, feito por Dyer e colaboradores em 2002. Os pesquisadores se dedicaram a entender e demonstrar por meio de diferentes técnicas o funcionamento de duas enzimas de tungue, a FAD2 e a FADX. Para isso, clonaram os genes que codificam para as enzimas FAD2 e FADX de tungue em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Com isso, conseguiram identificar que a FAD2 de tungue sintetiza ácido linoléico e que o FADX de tungue converte o mesmo em α -ESA (DYER et al, 2002).

Em 2004, dois anos depois, o mesmo grupo prosseguiu o trabalho decidindo clonar os genes que codificam para a dessaturase de ômega-3 (FAD3) de tungue em leveduras. Observaram então que a quantidade de ácido linolênico sintetizado nas células de levedura pela FAD3 de tungue foi cerca de 10 vezes maior que o observado pela expressão de um FAD3 de colza (*Brassica napus*) no mesmo organismo. Estes dados sugerem que FAD3 do tungue pode ser útil para a produção biotecnológica de ômega-3 em organismos transgênicos (DYER et al., 2004). O ômega-3 que é um ácido graxo de grande importância para a dieta humana e que atualmente se encontra em maior concentração em tecidos animais, como de peixes.

No ano seguinte, em 2005, Shockey e colaboradores propuseram a clonagem de duas isoformas de NADH: citocromo b5 redutase de sementes de tungue

(*VfCBR1A* e *VfCBR1B*), em *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 e em *Saccharomyces cerevisiae*. Tendo o objetivo de analisar a função e definir a localização subcelular dessas enzimas, ambas expressas no momento de desenvolvimento de sementes de tungue durante a síntese de óleo. Estas enzimas são responsáveis pela doação do par de elétrons que possibilita a redução de oxigênio em algumas reações, pois durante o ciclo catalítico do FAD2, dois átomos de hidrogênio são extraídos do substrato de ácidos graxos e transferidos para um átomo de oxigênio para produzir água como subproduto. Como resultados, após a superexpressão em *Saccharomyces cerevisiae*, o gene *VfCBR1A* foi enzimaticamente ativo e exibiu uma especificidade estrita para o NADH como redutor. A localização subcelular e as propriedades bioquímicas das enzimas de tungue são consistentes com um papel potencial na dessaturação e conjugação de ácidos graxos. As análises de imunofluorescência de célula de tabaco contendo CBR1A, CBR1B revelaram direcionamento definitivo das proteínas para o retículo endoplasmático, enquanto uma proteína CBR de *Arabidopsis thaliana* anteriormente não caracterizada foi direcionada especificamente para mitocôndrias (SHOCKEY et al., 2005).

Passando alguns anos, em 2011, os pesquisadores Heping Cao e colaboradores realizaram a expressão do gene *VfDGAT1* em *Escherichia coli* e posteriormente sua purificação por cromatografia de afinidade. Entretanto, devido à complexidade e entrelaçamento que a proteína foi produzida não foi possível a completa purificação da mesma (CAO et al., 2011).

Um ano depois, em 2012, o mesmo grupo realizou a expressão e purificação da proteína DGAT2 de tungue também em *E. coli*. Segundo os mesmos, ainda tiveram o objetivo de comparar a expressão da DGAT2 em *E. coli* com a expressão em leveduras. Contudo, devido ao fato de bactérias não realizarem modificações pós-traducionais ou a proteína estar dobrada, a mesma não exerceu sua função como em leveduras (*S. cerevisiae*). Além disso, foi verificado que a mesma deve estar associada a outras proteínas, lipídeos e membranas, como ocorreu com a DGAT1 no estudo relatado anteriormente (CAO et al., 2012). Estes dados corroboram o fato de que proteínas complexas como as citadas necessitam de um sistema de expressão eucarioto, como leveduras ou outras plantas.

O ano de 2012 foi um ano áureo para o tungue. Chen e colaboradores também propuseram a expressão de proteínas de tungue em organismos heterólogos. A

aposta dos pesquisadores foi expressar *VfDGAT2* e *VfFAD2* em *Aspergillus fumigatus*, um fungo endofítico isolado do próprio tungue. O experimento demonstrou que houve um aumento de mais de 6 vezes na produção de ácido linoléico em comparação com o fungo não transgênico (CHEN et al., 2012).

Um ano depois, em 2013, Cui e colaboradores trouxeram novamente a expressão de *VfDGAT2* em leveduras e comparam sua expressão com a expressão da mesma em outros tecidos do tungue. A levedura escolhida pelos pesquisadores foi uma espécie bem estudada por sua capacidade de produzir óleos, a levedura *Rhodotorula glutinis*. Como resultados obtiveram que *VfDGAT2* foi altamente expresso em clones de leveduras transgênicas, e o conteúdo total de ácidos graxos em um desses clones, *VfDGAT2-3*, foi 7,8 vezes maior do que no controle (CUI et al., 2013).

Em 2015, o mesmo grupo de pesquisa com associação entre outros colaboradores publicou um estudo sobre os efeitos dos genes *VfDGAT2* e *VfFAD2* em *Rhodotorula glutinis* e *Arabidopsis thaliana* no acúmulo de ácidos graxos. Os dados obtidos por PCR em tempo real revelaram níveis variáveis de expressão entre os transgênicos, com um nível de expressão mais alto de *VfDGAT2* do que de *VfFAD2*. A relação entre a expressão de *VfFAD2* e o ácido linoléico aumentou em *R. glutinis*, já em *A. thaliana* não apresentou diferença estatística. O nível de expressão de *VfDGAT2* foi estatisticamente correlacionado com o aumento do teor de ácidos graxos totais em *R. glutinis* e em *A. thaliana*. Com um nível de expressão semelhante entre os transformantes contendo um ou os dois genes, os co-transformantes *VfFAD2-VfDGAT2* apresentaram um maior rendimento de ácido linolênico (C18: 3) em *R. glutinis* (aumento de 174,36%) e *A. thaliana* (aumento de 14,61%), e o ácido eicosatrienóico (C20: 3) foi enriquecido (aumento de 17,10%) em *A. thaliana*. Estes dados sugerem que o *VfFAD2-VfDGAT2* teve um efeito sinérgico no metabolismo de ácidos graxos insaturados em *R. glutinis* e, em menor grau, em *A. thaliana* (CHEN et al., 2015).

No mesmo ano, Erp e colaboradores propuseram a clonagem de genes não só de tungue mas de mamona em *Arabidopsis thaliana*. Para o tungue, o gene escolhido foi *VfFAD* e *VfDGAT2*. Obtiveram que a expressão de *VfFAD* em *Arabidopsis* produziu aproximadamente 7,5% de α -ESA em lipídios de sementes. A co-expressão de *VfDGAT2* aumentou os níveis de α -ESA para aproximadamente 11%. A

superexpressão de *VfDGAT2* combinada com a supressão de *AtDGAT1* aumentou o acúmulo de α -ESA para 14% a 15% (ERP et al., 2015).

Após anos de diversos estudos aqui relatados, pode-se observar que ao longo do tempo foram construídas informações que hoje podem ser usadas para tornar a produção de óleo de tungue em outras plantas mais eficiente. Foi assim que em 2017, Yurchenko e colaboradores propuseram dentre diversas abordagens expressar a *VfDGAT2* juntamente com a *VfFADX* em *Arabidopsis*, utilizando uma variedade mutada que impede a decomposição de ácidos graxos, facilitando assim seu acúmulo. Os resultados demonstraram que houve um aumento sinérgico no teor de óleo das folhas de *Arabidopsis* e um acúmulo de α -ESA (YURCHENKO et al., 2017). Este estudo foi uma das principais fontes de inspiração para o presente trabalho.

O estudo mais recente que envolve a tentativa de clonagem de genes de tungue em outros organismos foi proposto ainda este ano, 2019, por Liu e colaboradores. O gene escolhido foi o que codifica para a proteína desidratase transportadora de beta-hidroxi-acil-acil (HAD) de tungue. Essa proteína catalisa a formação de enoil- [ACP] a partir de beta-hidroxilacil-[ACP] e desempenha um papel fundamental na determinação da composição de ácidos graxos durante o processo de biossíntese de óleo. O gene foi detectado em todos os órgãos da planta, mas seu transcrito foi o mais abundante nas sementes de tungue nas 20 semanas após a floração, quando o óleo se acumula mais rapidamente. O *VfHAD* foi clonado em *E. coli*, *S. cerevisiae* e *N. tabacum*, e como resultado se obteve que a expressão heteróloga de *VfHAD* aumentou significativamente o teor de ácidos graxos C16 em ambos os três organismos.

Estes estudos nos ajudam a compreender de forma mais ampla o metabolismo lipídico de tungue, e direcionar cada vez mais os estudos, uma vez que o conhecimento científico é feito de etapas.

3.4 A importância da bioinformática para análises *in silico*

Apesar de diferentes estudos estarem elucidando diversas questões relacionadas ao metabolismo de tungue ao longo dos anos, ainda se faz necessário que se entenda melhor o papel de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico do tungue, sobretudo as enzimas DGATs e FADs. Sendo assim, ferramentas de bioinformática podem ser um meio acessível para o fornecimento de informações

relevantes. Já que análises de bioinformática são ferramentas completas que permitem testar *in silico* diversas hipóteses pensadas pelos pesquisadores, e entender como funcionam alguns processos moleculares e bioquímicos nos organismos.

Dentre elas, podemos citar o alinhamento de sequências, que permite comparar por meio de *softwares* especializados as semelhanças encontradas entre diferentes sequências de aminoácidos das proteínas de interesse (HUNG e WENG, 2016). Além disso, podemos comparar essas sequências à nível evolutivo, através de árvores filogenéticas. Essa ferramenta permite que se observe ao longo da evolução o quão próximas ou distantes estão um organismo de outro, ou nesse caso, uma proteína de outra. Ainda, pode-se comparar a proximidade evolutiva entre proteínas de um mesmo grupo, analisando os motivos que foram conservados ou não, ao longo da diferenciação dessas proteínas em sua estrutura que ditam as funções dessas proteínas (CHOWDHURY e GARAI, 2017).

À nível interativo, é possível que através de ferramentas de bioinformática, se analise quais proteínas interagem com a proteínas de interesse em determinado meio, e ainda quais interações são essas. Como de coexpressão, quais proteínas são homólogas ou até mesmo identificar genes vizinhos.

Outra abordagem interessante utilizada é a análise de expressão *in silico*, onde, ferramentas especializadas identificam através da quantidade de *reads* de um *contig*, o quão ele é expresso em determinada situação. São utilizadas para essa análise sequências de bancos de mRNAseq. A análise da expressão de determinados genes habitualmente é feita *in vitro*, através de técnicas como a PCR em tempo real, da análise de micro arranjos, *SAGE* ou *Northern Blot*. Contudo, essas análises podem demandar mais tempo, material, reagentes, recursos humanos e custos em geral. Visto isso, e com o acesso de bancos de mRNAseq cada vez mais completos, incluindo os *on-line*, pode-se iniciar a realização de análises de expressão agora também de modo *in silico*.

Sendo assim, essas análises se fazem importantes para que entendamos, como, evolutivamente as enzimas envolvidas no metabolismo lipídico de tungue se diferenciam de outras plantas da mesma família a ponto de produzir o α -ESA.

3.5 Utilização de vetores virais para expressão heteróloga de proteínas em plantas

As plantas vêm sendo utilizadas como meio para produção heteróloga de proteínas há um tempo considerável. Seja para produção em larga escala de vacinas, proteínas utilizadas em formulações comerciais, ou purificadas e utilizadas para algum fim. Ao longo do tempo as técnicas de transformação genética foram sendo melhoradas, e as plantas se apresentam como uma boa alternativa de biofábrica. Isso se dá por possuírem a maquinaria eficiente de pós-tradução de eucariotos, e mesmo assim serem mais baratas que a utilização de células ou modelos animais, apresentando ainda maior taxa de sucesso e menor taxa de contaminação, juntamente com altas taxas de biomassa (MORTIMER et al., 2015).

Os vetores virais têm sido utilizados como um meio eficiente de introdução de transgenes em plantas, por possibilitarem a multiplicação deste quando inserido no local do genoma viral onde se encontram os genes associados ao processo de infecção, impedindo assim, que a mesma ocorra na planta. Esse método foi baseado na maquinaria de infecção do *Vírus do Mosaico do Tabaco* (TMV) (LINDBO, 2007). Atualmente existem diversos vetores virais, que semelhantes à um plasmídeo bacteriano, possibilitam que um inserto, contendo o gene de interesse, seja introduzido à maquinaria de transcrição da célula vegetal. Este vetor serve como um “facilitador” já que possui a capacidade inata proveniente do vírus de se multiplicar na célula vegetal, multiplicando assim o transgene. A expressão do gene na planta se dá de forma transiente, isso é, por um período de tempo limitado, o que faz com que a técnica seja ideal para determinar função de genes, podendo também ser utilizada para a produção de biofábricas vegetais.

Ao longo do tempo, a técnica foi aprimorada e foi visto que inserir o vetor viral recombinante contendo o gene de interesse em uma bactéria que naturalmente também infecta plantas tornaria o processo mais eficiente (MORTIMER et al., 2015). A bactéria em questão é a *Agrobacterium tumefaciens*, conhecida por causar a doença “galha da coroa” em plantas (TZFIRA et al., 2004). Contudo, as cepas utilizadas em técnicas de biologia molecular não possuem os genes que causam a doença, não interferindo na integridade da planta (BRASILEIRO, 2015). Surgiu assim o processo de agroinfiltração, processo pelo qual agrobactéria contendo o vetor viral recombinante, é introduzido na planta.

As vantagens de se utilizar vetores virais para transformação genética são diversas. No entanto a principal vantagem é a possibilidade de realizar a transformação na planta já adulta, não sendo necessário o cultivo *in vitro* para transformação na plântula (CANCADO et al., 2009). Eliminando esta etapa, eliminamos também as dificuldades encontradas no cultivo *in vitro*, como necessidade de padronização de cultivo, problemas com contaminações, necessidade de meios de cultivo mais elaborados e até mesmo ambiente estéril para realização das atividades (BRASILEIRO, 2015).

Neste trabalho, foi escolhido, devido à abordagem de superexpressão, a utilização do vetor viral TRBO (do inglês, "*TMV RNA-based overexpression*"). Além disso, este vetor apresenta boa taxa de infecção quando utilizado em tabaco, por ser uma variação do vetor TMV (LINDBO, 2007). Este vetor é produzido e vendido pela empresa Addgene e conta com sítios de restrição para diversas enzimas e outros elementos que podem ser observados na Figura 7.

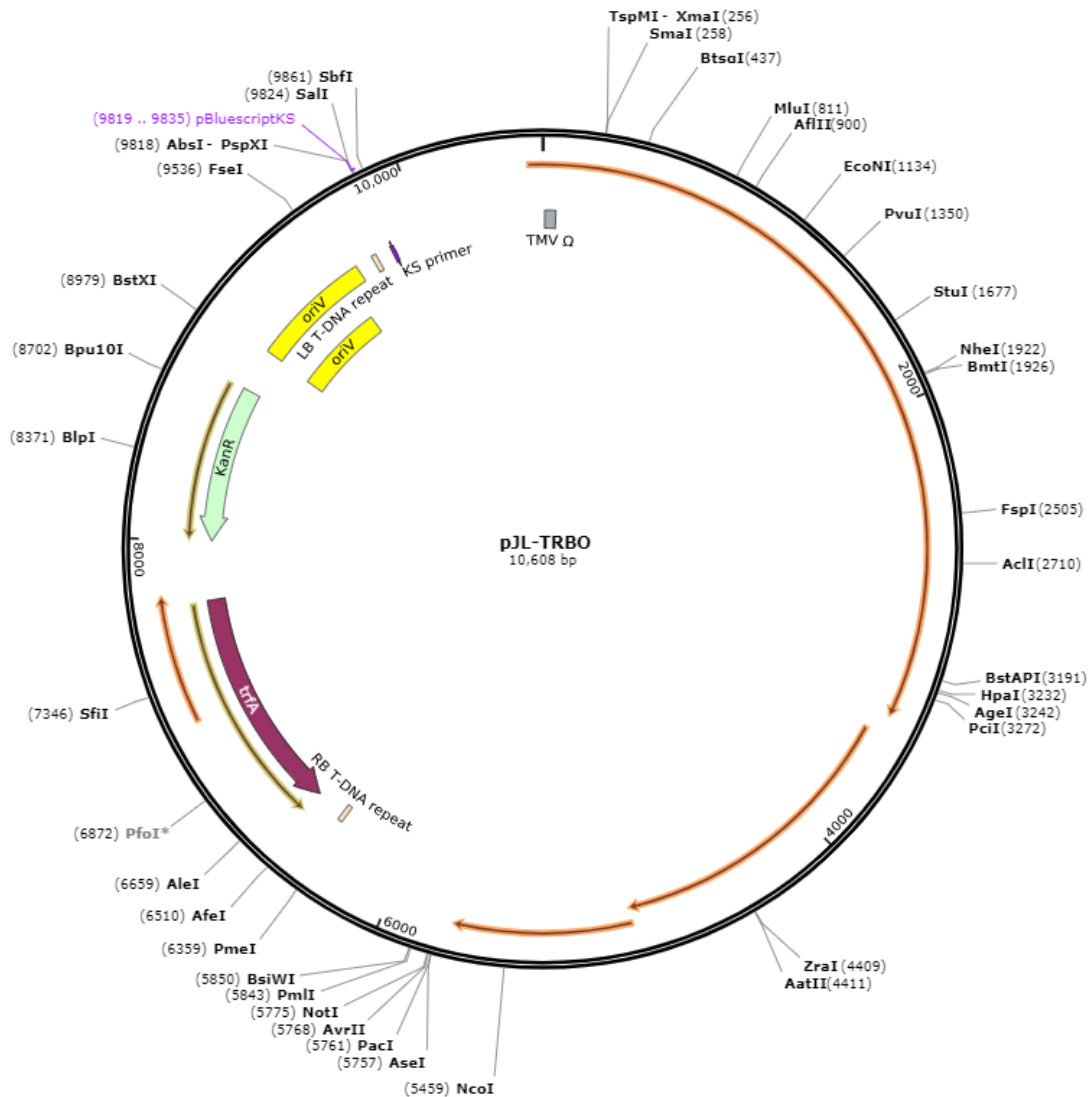


Figura 7: Mapa do vetor viral de pJL-TRBO

Podemos observar no vetor a presença de um elemento próximo aos 2000pb, o TMV-ômega. Este elemento é um *enhancer*, que tem o objetivo de ressaltar a expressão do vetor em tabaco. Além disso, pode-se notar a presença de origens de replicação para multiplicação do plasmídeo em bactérias, caracterizado pelo “oriV”. Vale ressaltar a presença das enzimas escolhidas, a *PacI* e *AvrII*. Demonstrado pelo símbolo “KanR” observa-se também a presença do marcador de seleção do vetor, para o antibiótico Kanamicina. Nos símbolos representado por pequenos quadradinhos, é possível observar a presença das “left” (LB T-DNA repeat) e “right” (LR T-DNA repeat) borders no vetor, ou seja, bordas esquerda e direita. O “T” em T-DNA é referente ao DNA de transferência necessário para que o plasmídeo seja

transcrito na planta que será inserido. Este começa a ser transcrito da esquerda para a direita. Vale ressaltar a presença das enzimas escolhidas, a *PacI* e *AvrII*, dentre outras diversas (Figura 7).

4 Materiais e Métodos

4.1 Análises *In silico*

4.1.2 Alinhamento de sequências e análise filogenética

Inicialmente as sequências de *VfDGATs* e *VfFADs* foram obtidas a partir de bancos de dados de RNAseq de tungue previamente obtidos pelo nosso grupo de pesquisa e depositados no GEO (*gene expression omnibus*) sob o número GSE50810, e diretamente a partir do GenBank (NCBI). Desta forma, foram localizadas diversas *contigs* correspondentes a sequências de *VfDGATs* e 7 sequências já curadas de *VfFADs*. Para determinar quais destes *contigs* de *VfDGATs* apresentavam sequências completas destes genes, os mesmos foram alinhados entre si utilizando a ferramenta ClustalW 1.8.1, e suas ORFs determinadas utilizando a ferramenta online ORFinder (NCBI). Este passo foi feito para realizar uma triagem inicial das sequências para posteriormente ser feito o seguinte alinhamento. Desta forma foram obtidas as sequências curadas de *VfDGATs*. A seguir, sequências de DGATs e FADS de mamona (*Ricinus communis*) e pinhão-mansão (*Jatropha curcas*) foram obtidas a partir do Genbank e alinhadas com as de tungue, previamente comentadas, com a ferramenta ClustalW 1.8.1, utilizando parâmetros padrão do mesmo. As sequências de mamona e de pinhão-mansão foram utilizadas a método de comparação com o tungue por se tratarem de plantas oleaginosas bem conhecidas da mesma família do tungue, a Euphorbiaceae.

Posteriormente, as sequências foram submetidas ao programa MEGA6, utilizando o método de agrupamento *Neighbor Joining*, com valores de *bootstrap* de 1000 (TAMURA et al., 2007). A edição da árvore gerada foi feita através da ferramenta online iTOL (itol.embl.de/upload.cgi)

4.1.3 Heat Map

O *Heat Map* foi realizado para aferir a expressão *in silico* dos genes das enzimas DGATs e FADs em tungue, utilizando o *software* MeV 4.9. O *Heat Map* é um mapa de calor que calcula por meio da quantidade de *reads* de um gene o quão ele é expresso.

Para a realização desta análise, as *contigs* correspondentes às sequências curadas de *VfDGATs* e *VfFADs* (obtidas conforme item anterior) foram localizadas nos dados suplementares apresentados por Galli et al (2014). Neste referido estudo, as sequências presentes no banco de mRNAseq obtido a partir de sementes maduras de tungue foram alinhados aos *contigs* de *DGATs* e *FADs* utilizando Bowtie v 0.12.7 com os parâmetros padrões a fim de verificar a abundância destes genes nesta biblioteca. A contagem das leituras foi realizada com auxílio da ferramenta SAMtools (version 0.1.16). Desta forma, o estudo informa o número de *reads* obtidos para cada uma das *contigs*. Estes dados foram utilizados para a geração deste *Heat map*.

4.1.4 Interatoma

Através da sequência de aminoácidos da proteína que mais demonstrou ser expressa no *Heat Map*, foi feita o interatoma com a ferramenta STRING 11.0 (db.org). O interatoma possibilita detectarmos as proteínas que estão interagindo com a proteína de interesse. É necessário entrar com a sequência de interesse e selecionar o organismo ao qual faz parte. Infelizmente o tungue não se encontra disponível no banco de dados, então a planta escolhida que mais se assemelhou ao tungue foi a mamona, que como já mencionado é uma Euphorbiaceae oleaginosa, assim como o tungue.

4.1.5 Análises de motivos

Esta análise foi realizada para aferir relações evolutivas entre as diferentes *DGATs* e *FADs* de tungue através da identificação de motivos conservados presentes nas mesmas. A análise foi feita utilizando a ferramenta MEME Suit 5.1.0.

4.2 Desenho de primers e Construção do vetor (*in silico*)

Primeiramente, as sequências de *VfDGAT2* e *VfFADX* foram obtidas do GenBank (NCBI), e foram salvas em arquivo FASTA. Após isso, através do software Vector NTI os primers *forward* (F) e *reverse* (R) foram desenhados. Foi levado em consideração os padrões de qualidade como temperatura de anelamento, quantidade de GC (guanina e citosina) tal como a quantidade de dímeros e *hairpins*. Os *primers* para *VfFADX* foram feitos a partir da maior ORF, que contém 1186 pares de base. Já

os *primers* para *VfDGAT2* foram desenhados a partir da maior ORF também, de 1068 pares de base.

Após, foi adicionada nas extremidades das sequências dos *primers*, sítios de clivagem para enzimas de restrição. As enzimas são necessárias para clivar o inserto e o vetor em posições concisas para que seja possível o encaixe do inserto no local correto do vetor TRBO. As mesmas foram escolhidas com base na melhor dupla que estivesse posicionada de forma estratégica no vetor TRBO, onde fosse possível adicionar a sequência dos insertos, os genes *VfDGAT2* e *VfFADX*. As enzimas escolhidas foram então a *PacI* e *AvrII* que clivam na posição 5' e na posição 3', respectivamente. A seguir, as sequências foram enviadas a empresa Thermo Fisher SCIENTIFIC para que fosse feita a síntese.

A montagem do vetor TRBO com os insertos *in silico* também foi realizada no *software* Vector NTI. Foi adicionado nos sítios de restrição das enzimas as sequências dos primers de *VfDGAT2* e *VfFADX*.

4.3 Extração de ácidos nucleicos, síntese de cDNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Inicialmente amostras de fruto maduro e folhas de tungue foram obtidas da sede da Embrapa Clima Temperado da cidade de Pelotas/RS. As amostras do fruto foram maceradas com auxílio de nitrogênio líquido e foram imediatamente armazenadas em ultrafreezer a -80 °C. As amostras de folha foram armazenadas em freezer a -20 °C até o momento das análises. Foi feita a extração de RNA de cerca de 0,1g de amostra de fruto maduro utilizando o reagente Concert Plant RNA Reagent (Thermo Fisher SCIENTIFIC™) conforme instruções do fabricante. A qualidade do RNA extraído foi avaliada através de eletroforese utilizando gel de agarose 0,5% e corado com brometo de etídio, enquanto que a concentração foi avaliada utilizando a técnica de espectrofotometria (NanoVue™ Plus GE Healthcare Life Science). 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 (Invitrogen™), conforme indicações do fabricante.

Para extração do DNA da folha de tungue, foi utilizado o reagente PureLink Total DNA Purification Kit (Invitrogen™) também de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade foi avaliada também por eletroforese em gel de agarose 1%

corado com brometo de etídio, e a concentração por espectrofotometria utilizando o mesmo equipamento.

Com o material genético a ser utilizado (cDNA ou DNA) extraído, e os primers específicos para os genes *VfDGAT2* e *VfFADX* foi realizada a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) para amplificação dos genes de interesse. As condições da PCR foram uma temperatura de desnaturação do DNA de 95°C, por 5 minutos, seguida por uma de 45 segundos, uma temperatura de anelamento de 50°C para ambos os genes através de 35 ciclos, uma temperatura ótima de reação para ação da enzima taq polimerase de 72°C por 45 segundos, e após a repetição dos ciclos, por 7 minutos. O reagente utilizado foi o kit GoTaq® Green Master Mixes (Promega™) em aparelho termociclador modelo T100™ (Bio-Rad). O produto da PCR foi verificado através de migração eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

4.4 Construção do vetor de clonagem (*in vitro*)

O vetor escolhido foi o vetor viral TRBO, adquirido comercialmente da empresa Addgene, para realização da construção do vetor foi necessário a extração do mesmo, que se encontrava inserido em bactéria do gênero *E-coli* cepa DH5-ALFA, adaptada para clonagem. Inicialmente foi feito um pré inóculo de 12 horas da bactéria para favorecimento do crescimento e multiplicação do vetor pela mesma, em meio Luria Bertani (LB), com antibiótico Kanamicina a 50mg/L utilizado como marcador de seleção. No dia seguinte, o pré-inóculo foi passado para um volume de meio LB maior, também com antibiótico, para obtenção de massa celular. Após isso, a extração do mesmo foi feita por protocolo adaptado através das Solução 1 de Lise, Solução 2 solubilizadora de lipídeos, e Solução 3 neutralizadora de pH que precipita o DNA cromossomal, onde por fim se adiciona o isopropanol para precipitação do DNA plasmidial, que é o de interesse (SAMBROOK and RUSSEL, 2001). A qualidade da extração do vetor plasmidial foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, enquanto que sua concentração foi avaliada por espectrofotometria (NanoVue™ Plus GE Healthcare Life Science). Após a extração do vetor, o mesmo foi clivado com enzimas de restrição escolhidas, *AvrII* e *PacI* conforme instruções do fabricante (Invitrogen™) para fazer abertura na região concisa

ao encaixe do inserto. Os padrões de cortes foram analisados também por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

5 Resultados e Discussão

Sendo assim, neste trabalho foram realizadas análises utilizando ferramentas de bioinformática que permitem elucidar melhor as questões envolvendo o metabolismo lipídico do tungue. Além disso, foram realizados os passos iniciais para clonagem de duas proteínas importantes também no metabolismo lipídico de tungue, a *VfDGAT2* e a *VfFADX*. Os resultados obtidos são apresentados nos itens subsequentes.

5.1 Análises *In silico*

5.1.2 Identificação e estrutura dos genes *VfDAGTs* e *VfFADs* e análises filogenéticas

Inicialmente foram realizados alinhamentos das sequências de *contigs* dos genes *VfDGAT* e *VfFAD* extraídos de bancos de mRNAseq e do Genbank através da ferramenta ClustalW (Figura 8). Os resultados serviram para que fosse possível fazer a triagem das sequências, determinar as sequências curadas, e também utilizá-las nas análises filogenéticas. Desta forma, foi possível a identificação de 3 formas de *VfDGATs*: a *VfDGAT1*, *VfDGAT2* e a *VfDGAT3* Solúvel (Figura 9). E também 7 formas de *VfFADs*: a *VfFADX*, *VfFAD2*, *VfFAD3*, *VfFAD3* Precursora, *VfFAD3* do RE, *VfFAD6* e *VfFAD9*.

Clustal Omega

[Input form](#)[Web services](#)[Help & Documentation](#)[Bioinformatics Tools FAQ](#)[Feedback](#)[Share](#)

Tools > Multiple Sequence Alignment > Clustal Omega

Multiple Sequence Alignment

Clustal Omega is a new multiple sequence alignment program that uses seeded guide trees and HMM profile-profile techniques to generate alignments between **three or more** sequences. For the alignment of two sequences please instead use our [pairwise sequence alignment tools](#).

Important note: This tool can align up to 4000 sequences or a maximum file size of 4 MB.

STEP 1 - Enter your input sequences

Enter or paste a set of

PROTEIN

sequences in any supported format:

Figura 8: Ferramenta Clustal Omega utilizada no alinhamento de seqüências.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

VfDGAT2      ----- 0
VfDGAT1      ----- 0
VfDGATSoluble MELSGVALRQLPCFSSRIVNSSEFRDKGHLQCYNYHGEARFVRCGPSSLSGKKEKESA 60

VfDGAT2      ----- 0
VfDGAT1      -----MTILETPDNSTDATTSGGAES-SSDLN-----LSLRRRRTA- 35
VfDGATSoluble MSKKKLKLLKGLSKDLSVFFQIDPNSQAKLVAEAAQELIKELQELRAKEKELKRNKKQE 120

VfDGAT2      ----- 0
VfDGAT1      -----SNSDGAV---AELASKIDELES----- 54
VfDGATSoluble KAKLKAEARINYQCQSSTSECSSECSNLRNGVVQPVLVELQQQLAIGHDTSSNLSKA 180

VfDGAT2      ----- 0
VfDGAT1      -----DAGGGQVIKDPGAEMDSGTLKSNKDCGTVKDRIENRENRRGGSDVK 100
VfDGATSoluble QAKRIEVCMGNKCKKSGGAALLEAFESVVG---VEGAVVGCKCM-----GKCRDGPNVR 231

VfDGAT2      -----MGMVEVKNEEEVTIFKSGEIYPT 23
VfDGAT1      FTYRPSVPAHRALKESPLSSDNIFKQSHAGLFNLCIVVLVAVNSRLIENIMQYGLIKT 160
VfDGATSoluble VN---AAHDPIT-----TPPNSYPLCIGVLEDVG-VIVANYF----- 265
                                     : :
                                     : :

VfDGAT2      NIFQSVLALAIWLGSFHFILFLVSSIFLPSKFLLLVIGLLLFFMVIPINDRSKLGQCLF 83
VfDGAT1      GWFSSRSLRDWPLLMCC-----LTLPIFSL-----A 187
VfDGATSoluble --QDKKHLGLAPAS----- 278
          *

VfDGAT2      SYI-SRHVCSYFPITLHVEDINAFRSDRAYVFGYEPHSVFPIGVMILSLGLIPLPNIKFL 142
VfDGAT1      AYLVEKLACRKYISAPTVVFLHILFS-----STAVLYPVSVILSC-ESAVLSGVA-- 236
VfDGATSoluble ----- 278

VfDGAT2      ASSAVFYTPFLRHIWSWCGLTPATRKNFVSLSSGYSCILVPGGVQETFYMKQDSEVLLL 202
VfDGAT1      -----LMLFA--CIVWLKLVSYAHTNFDRAIA---NSVDKGDALSNASSAESHDVSF 285
VfDGATSoluble ----- 278

```

Figura 9: Exemplificação dos dados que são gerados na ferramenta de alinhamento. Na figura vemos o alinhamento das sequências de DGATs de tungue, no entanto, como mencionado, essa análise foi feita para todas as sequências de DGATs e FADs de tungue, mamona e pinhão-mansão.

As sequências gênicas das *VfDGATs* e *VfFADs* curadas foram então avaliadas quanto ao tamanho e orientação de suas regiões codificadoras através da ferramenta ORFinder (NCBI) (Figura 10). Conforme observado na Tabela 1, as DGATs variaram de tamanho de 223 a 319 aa, sendo que a DGAT1 se apresentou em sentido *antisense*, e as DGATs 2 e 3 em sentido *sense*. Quanto às FADs, variaram de tamanho entre 300 a 458 aa. Com exceção a FAD2, que se apresentou em sentido *sense*, todas as demais FADs se apresentaram em sentido *antisense* (Tabela 2).

As informações de nome, abreviação, *contigs*, tamanho em aminoácidos (aa), posição inicial e final dos mesmos, e análise de quadros de leitura (*frames*), nos ajudam a classificar as sequências em seus tamanhos, e verificar onde começam e terminam essas sequências de aminoácidos. Pode-se observar que as *contigs*, tanto de DGATs quanto de FADs, continham tamanhos similares em aminoácidos, mas correspondiam a genes diferentes. As maiores *contigs* analisadas de cada *VfDGAT* e *VfFAD* foram utilizadas para geração de uma árvore filogenética e estão contidas na tabela.

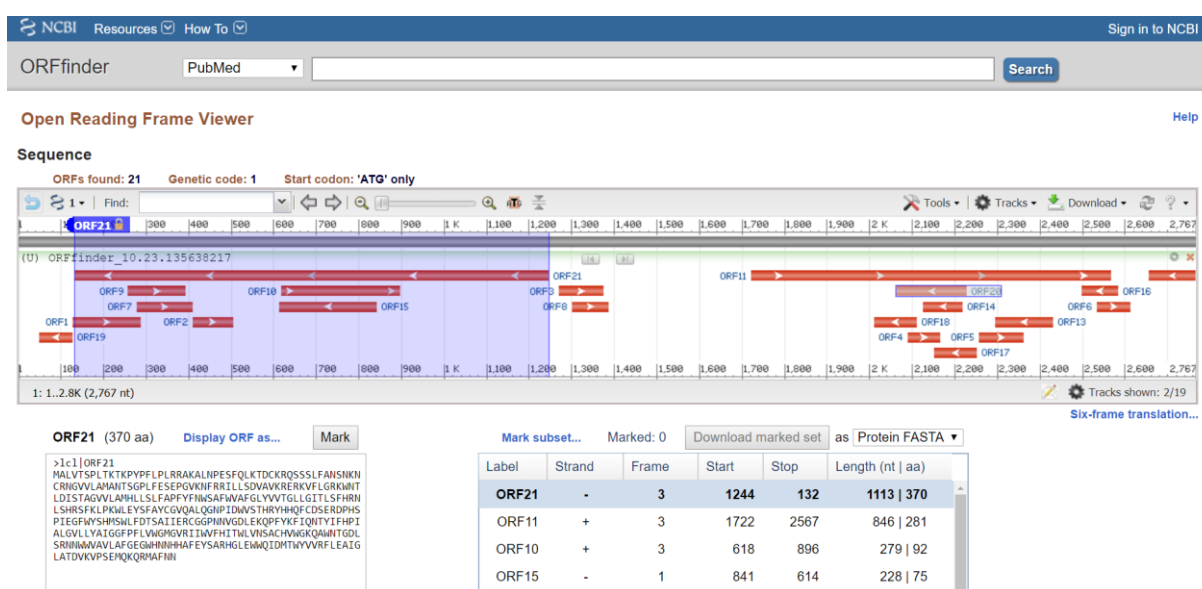


Figura 10: Demonstração da ferramenta ORFinder (NCBI).

Tabela 1 - Dados das sequências de *VfDGATs*.

Nome	Abreviação	Contig	Tamanho (aa)	Posi. inicial (aa)	Posi. final (aa)	Frame
Diacilglicerol Aciltransferase 1	DGAT1	21_Locus_555_Transcript_10_14	319	1880	921	-3
Diacilglicerol Aciltransferase 2	DGAT2	21_Locus_4727_Transcript_8_10	223	228	899	+3
Diacilglicerol Aciltransferase 3 (solúvel)	DGAT3	-	278	1	837	+1

Tabela 2 - Dados das sequências de *VfFADs* de tungue.

Nome	Abreviação	Contig	Tamanho (aa)	Posi. inicial (aa)	Posi. final (aa)	Frame
Delta 12 dessaturase de ácido graxo	FAD2	51_Locus_184_contig_5_6	383	432	1583	+3
Dessaturase/conjugase de ácido graxo	FADX	31_Locus_16_contig_5651_6924	386	1337	177	-2
Ômega-3 desaturase de ácido graxos	FAD3	21_Locus_314_contig_13_20	458	1400	24	-3
Ômega-3 dessaturase de AG (RE)	FAD3 RE	51_Locus_14571_contig_3_4	300	1346	444	-3
Omega-3 dessaturase de ácido graxo precursora	FAD3 Precursora	31_Locus_4593_contig_4_4	452	1789	431	-3
Ômega-6 dessaturase de AG (cloroplasto)	FAD6	41_Locus_1134_contig_5_9	417	1890	637	-1
Delta 9 dessaturase de ácido graxo	FAD9	21_Locus_244_contig_22_25	370	1244	132	-3

Após, foi realizada a análise filogenética utilizando as sequências curadas de DGATs e FADs de tungue, além das sequências de mamona e pinhão-mansão, para aferir as relações evolutivas dessas enzimas nas três plantas.

A respeito da árvore filogenética das DGATs, pode-se observar que na Figura 11, foram formados 3 cladogramas distintos, sendo que 1 clado contém somente as DGATs1, outro somente as DGATs2 e outro com as DGATs3 Solúveis.

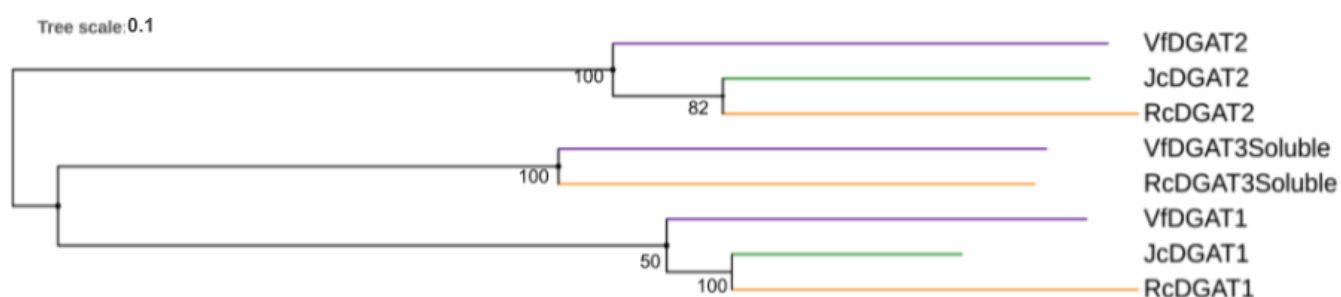


Figura 11: Árvore filogenética das DGATs de tungue (*Vf*), mamona (*Rc*) e pinhão-mansão (*Jc*), com os valores de *bootstrap* descritos.

Pode-se confirmar que existe a identidade em cada uma das sequências preditas de DGATs obtidas de tungue, visto que *VfDGAT1* se encontra no clado das DGATs1, a *VfDGAT2* no clado das DGATs2 e a *VfDGAT3* no clado das DGATs3. Além disso, deve-se ressaltar a proximidade da *VfDGAT3* com a *RcDGAT3*, que já havia

sido observada anteriormente por Cao et al., 2013. Esses dados demonstram como genes semelhantes se conservam ao longo da evolução em plantas das mesmas famílias para manter funções importantes para as mesmas. Além disso, sugerem que a divergência das 3 sequências ocorreu antes do surgimento destas 3 espécies e que apenas pequenas modificações na sequência aminoacídica ocorreram após esta especiação, caracterizando as sequências de DGATs de *Vf* ortólogos das de *Jc* e *Rc*.

Já na árvore filogenética das FADs, observa-se na Figura 12, que mais clados foram formados, já que a família das FADs é mais ampla e inclui outros grupos de dessaturases. Sendo assim, foi formado um clado composto majoritariamente de FADs3, onde contém também, no entanto, a *JcFAD2* do RE, o que indica que esta é mais próxima das FADs3 do que das FADs2 propriamente ditas, diferente da *JcFAD2* que não se encontra no RE. O outro é composto de FADs2, e nesse clado também estão presentes as FADsX, o que demonstra que as FADsX são cópias que se originaram a partir das FADs2, e se assemelham mais a FAD2 de *Jc*, do que a FAD2 de tungue. Além disso, foram formados clados que incluem as FADs Sintase e FADs oxirredutases. Essas últimas, ainda não estão bem caracterizadas em tungue, motivo pelos quais não foram apresentadas na árvore. Ainda, deve-se citar que foram formados dois subclados independentes dentro do clado das FADs2 e FADs3: o subclado da *VfFAD9* e o subclado da *VfFAD6*, sugerindo que estas enzimas surgiram ainda antes da diversificação entre FAD2, FAD3 e FADX, e que a *VfFAD6* surgiu a partir de mutações da *VfFAD9*. Além disso, a diferença a nível aminoacídica sugere que apresentam funções distintas das demais FADs. Essas enzimas são atualmente pouco caracterizadas, justamente pelo fato de não serem descritas versões ortólogas em outros organismos como temos das FAD2 e 3, por exemplo.

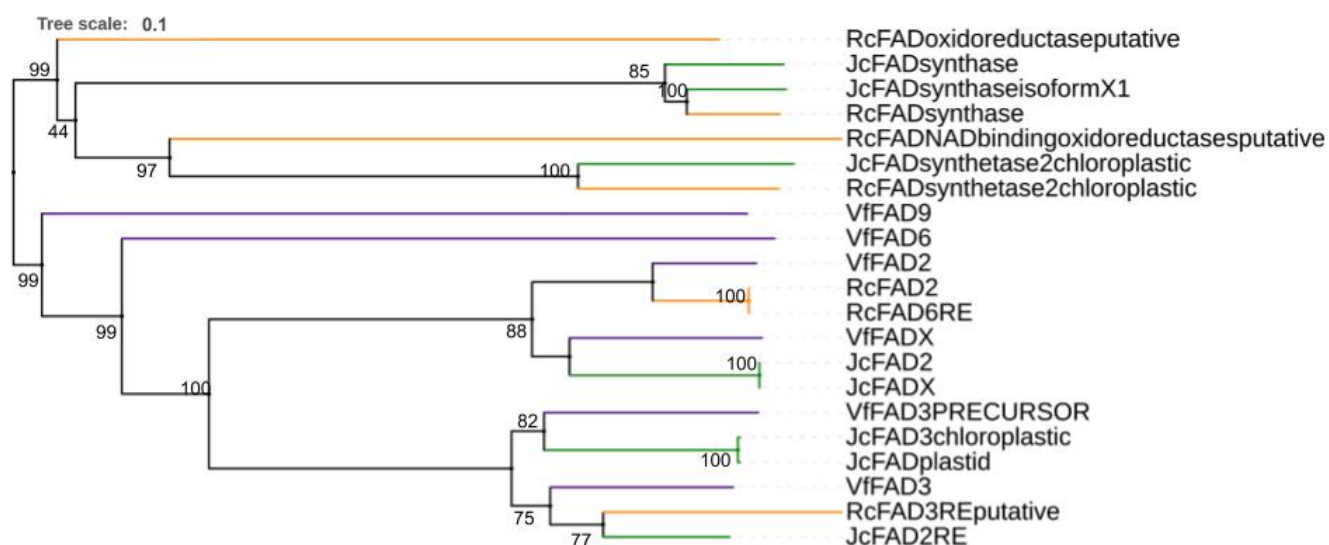


Figura 12: Árvore filogenética de FADs de tungue (*Vf*), mamona (*Rc*) e pinhão-manso (*Jc*), com os valores de *bootstrap* descritos.

No caso das FADs, foi observado o mesmo padrão que se observou nas DGATs, em praticamente todas as enzimas. Além disso, deve ser ressaltada as proximidades evolutivas que as enzimas que se localizam no mesmo compartimento dentro da célula apresentam. Como é o caso da FAD3 de mamona e pinhão-manso que se encontram no RE.

Após, foi realizado a análise de motivos conservados entre as *VfDGATs* e *VfFADs* de tungue de acordo com o item 4.1.5. Podemos observar na Figura 13 que foram encontrados 5 motivos entre as *VfDGATs*. Sendo que desses, os motivos 2, 3 e 4 estão presentes nas 3 cópias de *VfDGATs*, o motivo 1 presente na DGAT1 e na DGAT3 e o motivo 5 na DGAT1 e DGAT2. Esses dados demonstram que as regiões foram conservadas nos genes que codificam para as *VfDGATs* em tungue, devido a semelhança nas funções que as mesmas exercem. O que vai de encontro com as proximidades evolutivas encontradas na árvore filogenética apresentada acima. No entanto, existem algumas divergências na quantidade e locais de motivos entre as sequências, que demonstram que essas proteínas diferem entre si em possuem funções distintas. Essas diferenças podem ser a nível de especificidade ou tipos de substratos em que atuam ou mesmo local de função em diferentes compartimentos celulares, diferentes tecidos ou momentos ao longo do desenvolvimento da planta.

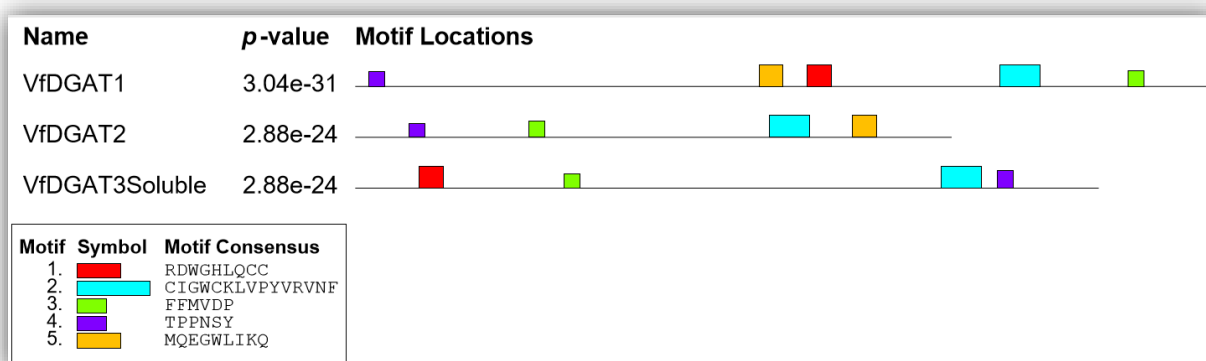


Figura 13: Motivos conservados encontrados nas sequências das enzimas DGATs de tungue.

Já se tratando dos motivos conservados em FADs de tungue, (Figura 14) foram encontrados também 5 motivos, onde destes, todos estão presentes em todas as FADs, com variações apenas na localização dos mesmo. Com exceção da *VfFAD6*, que apresentou somente os motivos 1 e 2. Vale destacar que os genes *VfFAD2* e *VfFADX* são os que possuem a maior proximidades entre si. Podemos observar também que o gene que mais se distancia é o *VfFAD6*, o que corrobora com os dados obtidos na árvore filogenética acima, onde podemos observar que ele pode ser um gene mais derivado, que sofreu mais modificações ao longo da evolução, não mantendo tantas regiões conservadas, já que o surgimento desta FAD pode ter conferido vantagem adaptativa à planta e, por isso, se manteve evolutivamente.

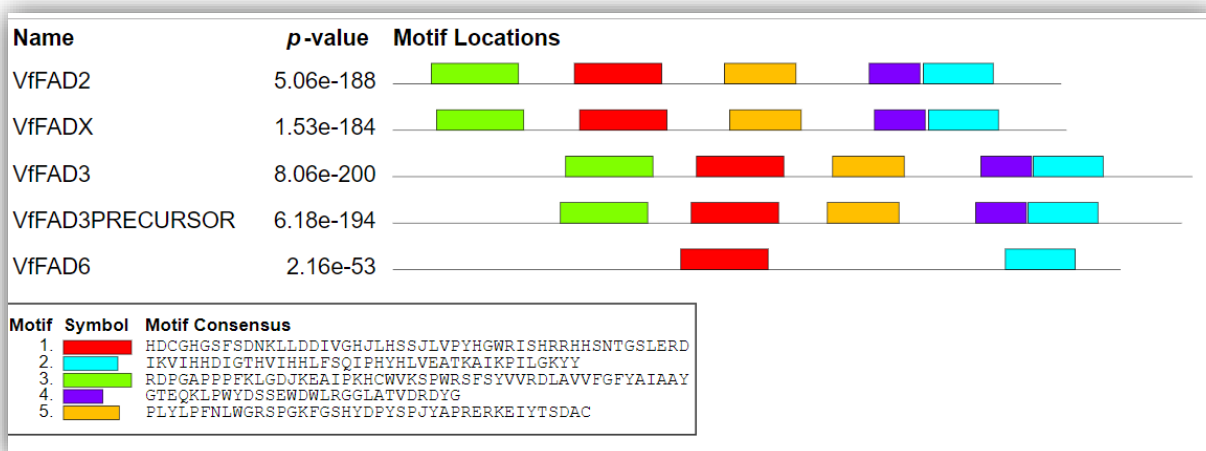


Figura 14: Motivos conservados encontrados nas sequências das enzimas FADs de tungue.

5.1.3 Análises de expressão *in silico*

Foi realizada uma análise de expressão *in silico* para geração do *Heat Map* das sequências de DGATs e FADs de tungue (Figuras 15 e 16). A leitura do mapa se dá de acordo com as cores mais quentes do mesmo, como demonstrado na linha de cima de cada mapa, que vai de tom azul vivo até amarelo vivo, onde temos o maior número de *reads*, isso é, uma expressão mais acentuada.

Na Figura 15, pode-se observar que o gene mais expresso foi o *VfDGAT1*, seguido de *VfDGAT2* e por fim o *VfDGATX* (*VfDGAT3* solúvel). No entanto, era esperado que, de acordo com a literatura e estudos *in vitro*, *VfDGAT2* fosse a mais expressa em frutos maduros de tungue, contudo, *VfDGAT1* obteve um maior número de *reads* nesta análise. Porém, a *VfDGAT1* não deixa de apresentar taxas de expressão relativa altas em frutos maduros, corroborando para esses dados (GALLI et al., 2014). Esse fato pode ser devido aos dados descritos na literatura não apresentarem uma comparação entre as cópias, apenas entre as amostras avaliadas. Além disso, deve-se ressaltar que as análises de expressão *in silico*, são baseadas no alinhamento dos *reads*, e se houve qualquer interferência no processo de sequenciamento, pode haver uma modificação na quantidade de *reads*, superestimando as sequências mais expressas no momento do sequenciamento.

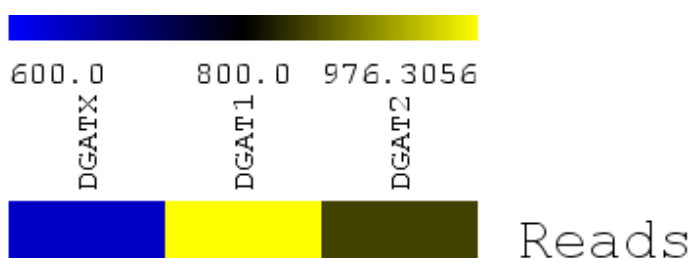


Figura 15: *Heat Map* das sequências de DGATs de tungue.

Já na Figura 16, os dados de FADs demonstram que a maior expressão se deu da *VfFADX* e *VfFAD2*, seguido da *VfFAD6*, da *VfFAD9*, da *VfFAD3* Precursora, e por fim da *VfFAD3* e *VfFAD3* do RE. Estes dados foram esperados, já que havia sido demonstrado em outros estudos *in vitro*, que a *VfFADX* é altamente expressa no fruto maduro, que foi o parâmetro utilizado para esta análise (SHOCKEY et al., 2016). Além disso, em Galli et al.,(2014) pode ser observado *in vitro*, esse mesmo padrão de expressão quando olhamos para os dados apresentados em fruto maduro, o que indica correlação positiva entre avaliação *in silico* e *in vitro*.



Figura 16: *Heat Map* das sequências de FADs de tungue.

Visto isso, pode-se dizer que a análise de expressão *in silico* é um parâmetro relevante a ser analisado, mas não é perfeito, se fazendo interessante a combinação de diferentes métodos para uma melhor confiabilidade.

5.1.4 Análise de interatoma

Após a obtenção dos demais dados de bioinformática, se fazia interessante verificar, através de um interatoma, quais proteínas interagem e que tipo de interação faziam, com algumas das DGATs e FADs de tungue.

As reações metabólicas nos organismos são muito complexas e envolvem diversas enzimas que se relacionam entre si (MANAN et al., 2017). Essa afirmação pode ser vista através dos interatomas gerados. Nos 3 interatomas, realizados com as sequências de DGAT1, DGAT2 e FADX, podemos observar a presença de diferentes enzimas que não participam somente do metabolismo lipídico mas de outras reações que precisam ocorrer na célula. Os interatomas obtidos forneceram informações de proteínas pertencentes a interações do tipo *textmining*, co-expressão e com validação experimental, os quais são representados através de linhas amarelas, pretas e rosadas, respectivamente (Figura 17).

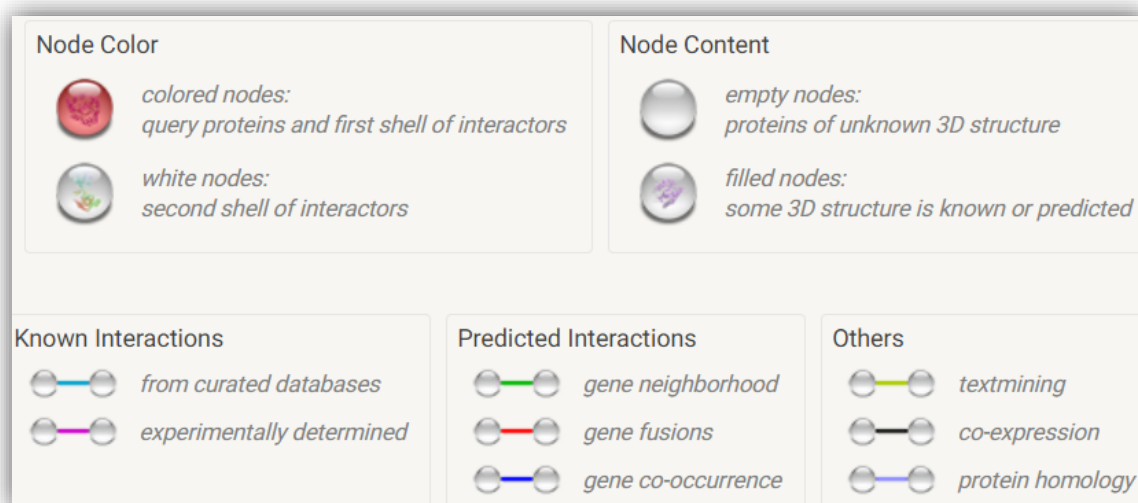


Figura 17: Legenda obtida da ferramenta STRING que demonstra o que cada cor significa no interatoma.

Na Figura 18, podemos observar nas linhas pretas uma co-expressão entre a DGAT1 de tungue e diversas proteínas que interagem entre elas. A exemplo da fosfolipase D que aparece em duas isoformas no interatoma. Essa enzima está envolvida no metabolismo de fosfolipídeos estruturais, como a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina, e seus principais produtos são o ácido fosfatídico, que é apresentado na Figura 5 do item 3.2 deste trabalho, como integrante da rota de lipídeos em plantas, que tem uma função ímpar na transdução de sinal intracelular, e a colina (KOLESNIKOV et al., 2012). Além disso, ocorre uma interação de coexpressão também com a Peroxina 3 (Pex3), que juntamente com a Pex19 e Pex12 denominada no interatoma “Proteína de biogênese do peroxissomo 12” são essenciais para a biogênese de peroxissomos e direcionamento de proteínas para a membrana do peroxissomo (THEODOULOU, et al., 2013). Pode-se observar também na Figura 5, a importância do peroxissomo no metabolismo lipídico, e não só nele mas em diferentes funções celulares. Além disso, são demonstradas outras proteínas como de ligação ao DNA, de ligação a íons metálicos, e fatores de transcrição, que não necessariamente estão diretamente ligados ao metabolismo lipídico mas desempenham funções gerais na célula, e indiretamente se correlacionam com os níveis de DGAT1 nas células.

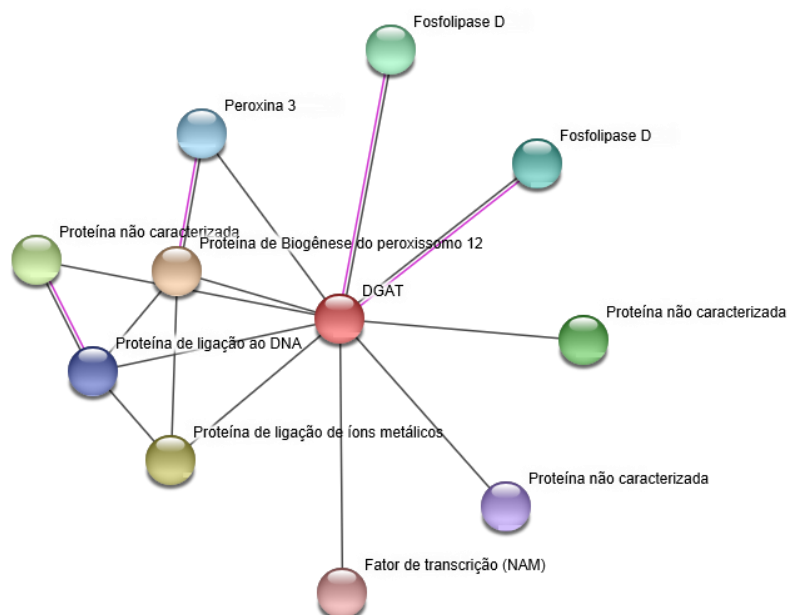


Figura 18: Resultado do interatoma realizado com a proteína DGAT1.

Já no interatoma da DGAT2 (Figura 19), podemos observar a presença de proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico; no entanto, a maioria destas interações não são de co-expressão e sim de *textmining*, ou seja, foram citadas nas mesmas publicações em que a palavra 'DGAT2' foi citada. Estas interações do tipo *textmining* (linhas amarelas) como é o caso da proteína de Destoxificação de proteínas, da Proteína N-benzoiltransferase de antranilato e de outras proteínas que ainda não foram caracterizadas. Já as interações do tipo co-expressão (linhas pretas) apontaram para proteínas esperadas, como as DGATs 1 e 3. Além disso, pode-se citar a interação com as diferentes isoformas da PDAT 1 e 2 (fosfolípido diacilglicerol aciltransferase) que é uma enzima com função e localização bem próxima as DGATs catalisando também os DAGs (MANAN et al., 2017).

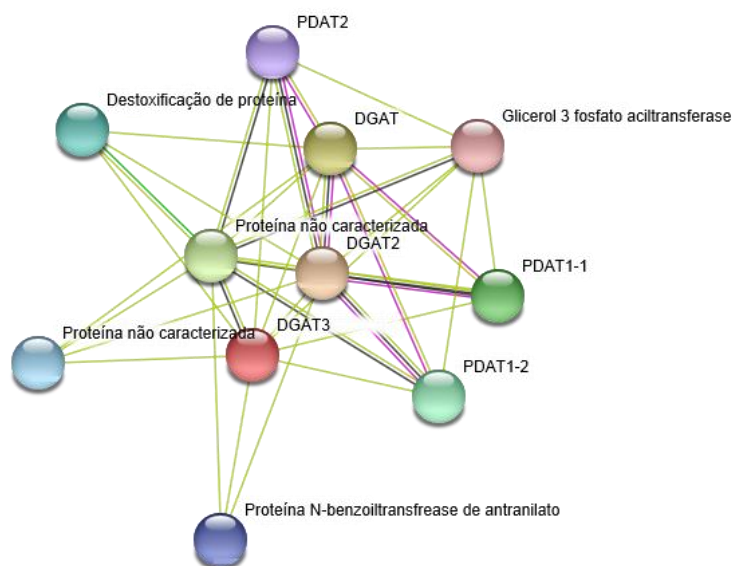


Figura 19: Resultado do interatoma realizado com a proteína DGAT2.

Por fim, analisando o interatoma da FAD2 de tungue (Figura 20), também são encontradas diferentes interações do tipo *textminings* (linhas amarelas), mas também de co-expressão (linhas pretas), além de interações determinadas experimentalmente (linhas rosadas). Pode-se observar a presença de interações de co-expressão com as DGATs, o que é um fato bem interessante e corrobora para o embasamento do trabalho de que esses grupos de enzimas estão interligadas no metabolismo de lipídios. Além disso, observamos interações com outras FADs, como a FAD3 e FAD9. Observa-se uma interação de co-expressão com a proteína 3 Oxoacil sintase, e com outra proteína transportadora de grupamentos acil, aos quais interagem também com as FADs presentes no interatoma. Observa-se ainda a presença da KASII desempenhando diversas interações com as proteínas presentes no interatoma, isso por ser uma cetoacil sintase, essa enzima (juntamente com as outras enzimas KAS) adicionam carbonos para alongamento de cadeias de AG (LI-BEISSON et al., 2013). Por fim, deve ser citada a presença da enzima NIA (nitrato redutase) que reduz o nitrato a nitrito e está envolvida no metabolismo de praticamente todas as plantas (DONATO et al., 2004).

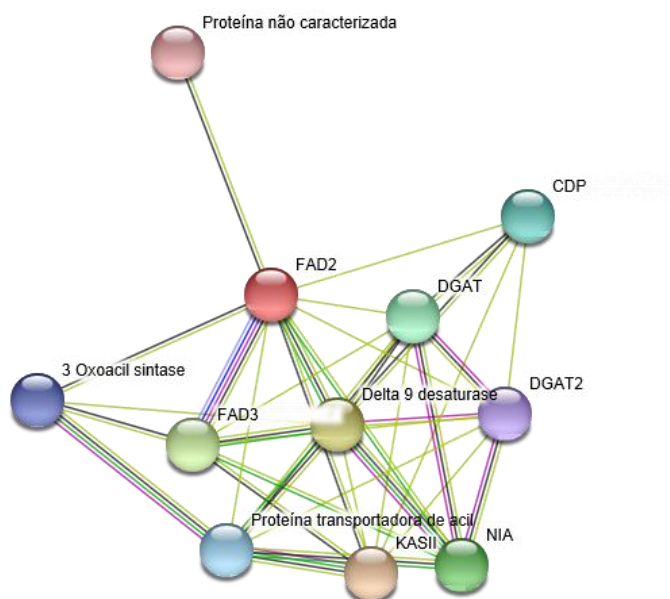


Figura 20: Resultado do interatoma realizado com a proteína FAD2.

5.2 Clonagem dos genes *VfDGAT2* e *VfFADX* em vetor viral

Foi então que, através dos dados obtidos com as análises de bioinformática, e com dados coletados na literatura, decidiu-se dar início a clonagem dos genes *VfDGAT2* e *VfFADX*.

Os *primers* foram desenhados no *software* Vector NTI seguindo as diretrizes padrão incluindo sequências relativas aos sítios de restrição enzimática (Figuras 21 e 22). Ao passo seguinte, foi obtido as sequências de *primers* demonstrada na Tabela 3.



Figura 21: Demonstração dos *primers forward* (F) e *reverse* (R) de *VfDGAT2* e as sequências das enzimas de restrição *PacI* e *AvrII* nas extremidades.

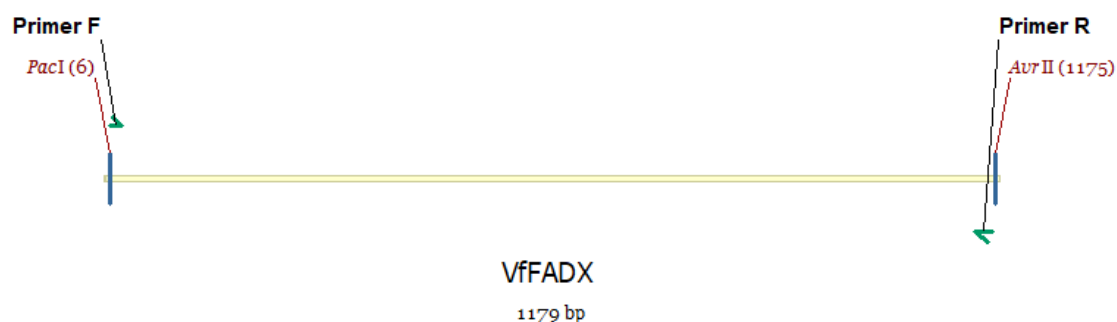


Figura 22: Demonstração dos *primers forward* (F) e *reverse* (R) de *VfFADX* e as sequências das enzimas de restrição *PacI* e *AvrII* nas extremidades.

Tabela 3 - Sequências de *primers* dos genes *VfDGAT2* e *VfFADX*.

Gene	Sequência dos <i>Primers</i> 5' 3'
<i>VfDGAT2</i> F	TACTCTCCTCTTAATAAGAGTATTG
<i>VfDGAT2</i> R	TAAACTTGAAATTTTTTGACC
<i>VfFADX</i> F	CTTAACAGAACAATGGGAG
<i>VfFADX</i> R	TCTGGTATAGTAATAAGTTTTGA

Como as sequências de *primers* tinham o objetivo de amplificar a proteína integral, os mesmos foram desenhados nas extremidades das sequências gênicas, apesar de o programa ter informado que os primers desenhados possam formar dímeros e *hairpins*, que eventualmente poderiam influenciar na eficiência dos *primers*.

Com as sequências desenhadas, foi feita a montagem *in silico* dos genes de interesse, no vetor TRBO através do *software* Vector NTI (Figuras 23 e 24).

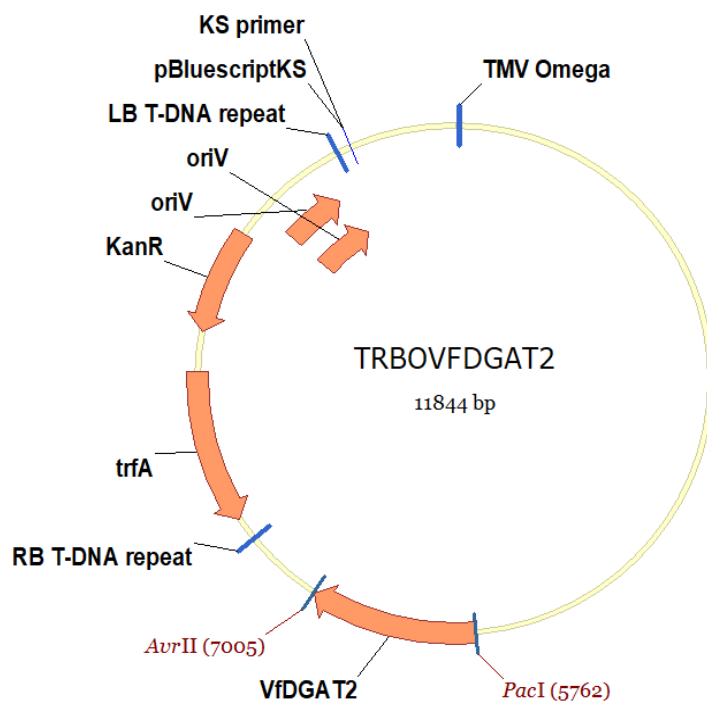


Figura 23: Demonstração do vetor viral TRBO+ *VfDGAT2*.

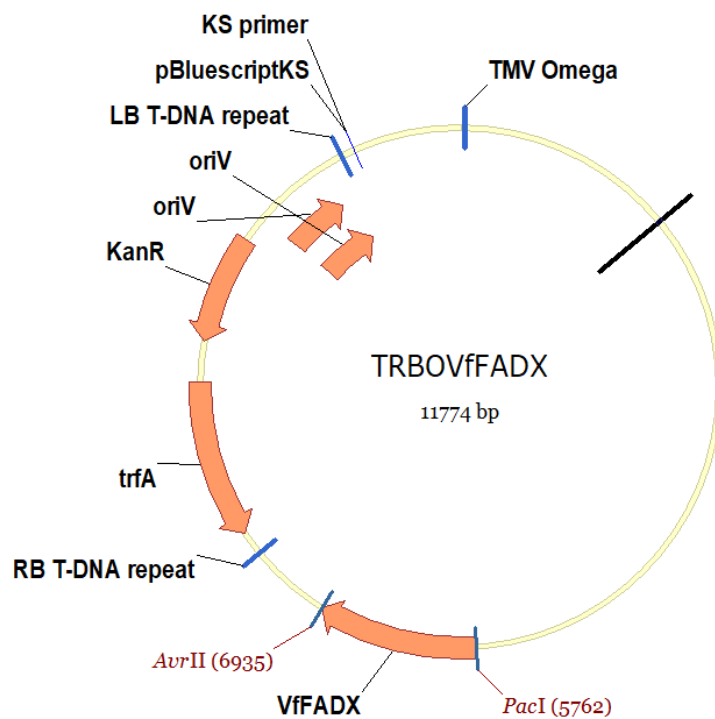


Figura 24: Demonstração do vetor viral TRBO+ *VfFADX*.

Seguindo os passos para realização da clonagem, foi feita a extração do ácidos nucléicos de tungue conforme descrito no item 4.3 onde, os resultados são demonstrados através da migração eletroforética em gel de agarose.

O material genético extraído (fosse RNA ou DNA) serviria como molde para amplificação de *VfDGAT2* e *VfFADX*. Para isso, era necessário que o mesmo tivesse uma qualidade e integridade adequadas para que não houvessem contaminantes, que resultassem em inibição da PCR. A qualidade do RNA foi aferida conforme item 4.3, e como resultados obtivemos uma concentração de 368,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; a razão $A_{260/280}$ nm (relação ácido nucléico/proteína) foi de 1,94; e a razão de $A_{260/230}$ nm (relação proteína/compostos fenólicos) de 1,02. Esses resultados indicam uma qualidade suficiente para prosseguirmos com a PCR. A qualidade do DNA também foi aferida de acordo com o item 4.3 e os resultados obtidos foram uma concentração de 114,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; razão $A_{260/280}$ nm de 1,6; e a razão de $A_{260/230}$ nm 0,5. Esses resultados indicam uma qualidade suficiente para prosseguirmos com a PCR, já que os valores ideais destas razões vão de 1,8 a 2,2 de qualidade. Na Figura 25, pode-se observar as bandas de DNA de tungue em gel de eletroforese. No gel pode-se observar que há pouca ou nenhuma degradação no DNA.

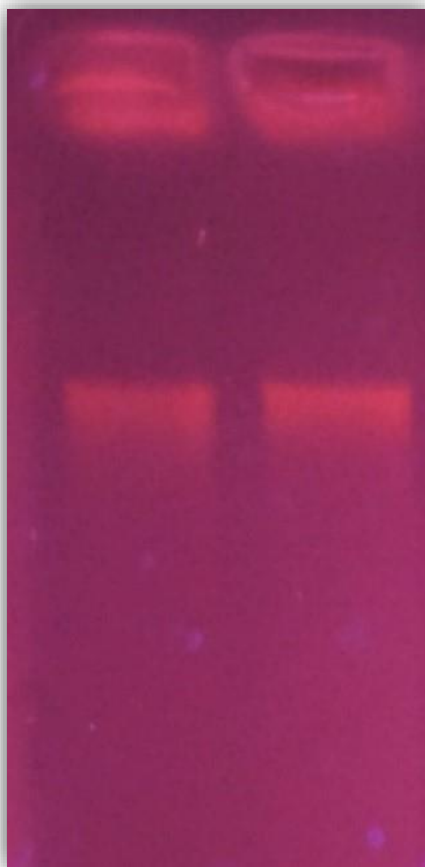


Figura 25: Gel de eletroforese demonstrando a extração de DNA de tungue. As duas bandas representam duplicatas da extração.

O gene *VfDGAT2* foi amplificado com sucesso, como demonstrado na Figura 26, permitindo a utilização deste amplicon para os procedimentos de clonagem. Foram utilizados *primers* que amplificassem a proteína ubiquitina como controle positivo das reações de PCR, sendo esta um gene endógeno em plantas, incluindo o tungue.

No entanto, dificuldades foram encontradas não permitindo que fosse feita a amplificação do gene *VfFADX* até o presente momento (Figura 26). Uma vez que variáveis como condições da reação de PCR, amostra e reagentes foram testadas, acredita-se que a razão pela qual não se tenha obtido êxito tenha sido a baixa eficiência dos *primers*, que foi a única variável que não foi possível ser alterada devido a questões de tempo e orçamento. É sabido que para que o gene seja amplificado, diversas condições devem estar adequadas, como qualidade do material genético, qualidade dos reagentes, *primers* puros e sem contaminação, *primers* que não

formem dímeros e alças, sendo este último, um fator que não foi possível alcançar até o momento.

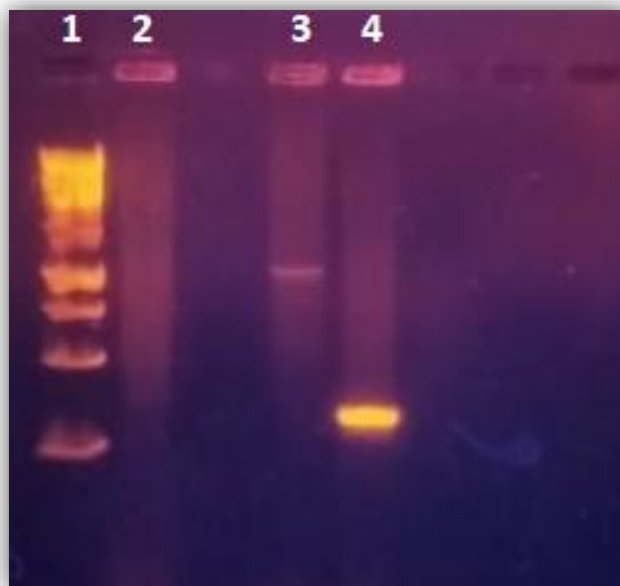


Figura 26: Gel de eletroforese demonstrando o resultado da amplificação por PCR dos genes *VfDGAT2* e *VfFADX*, onde 1: marcador de peso molecular; 2: *VfFADX*; 3: *VfDGAT2*; 4: Controle ubiquitina.

A seguir, foi realizada a extração do vetor TRBO para que fosse possível prosseguirmos com os cortes utilizando enzimas de restrição, para posterior montagem com o inserto, o gene *VfDGAT2*. Como observado nas Figuras 27 A e B, o vetor TRBO se comporta de duas formas distintas de acordo com seu enovelamento, ou de sua conformação, por se tratar de um construção de DNA circular que pode se linearizar e mostrar um padrão de banda distinto no gel de agarose.

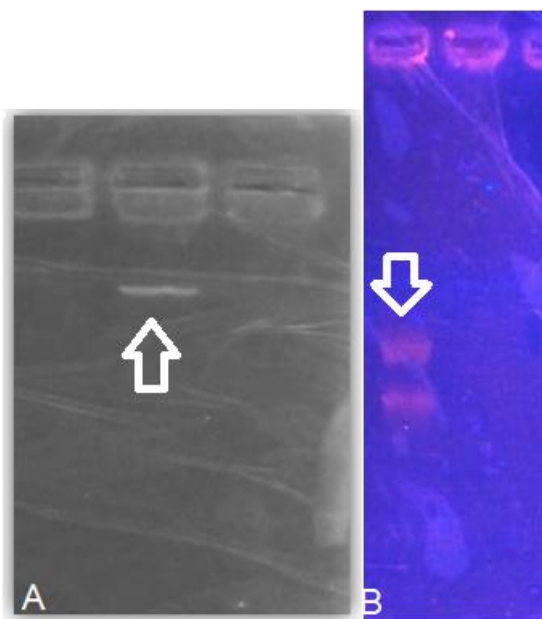


Figura 27A: Gel de eletroforese demonstrando a extração do vetor TRBO na conformação de 1 banda indicada com a seta. 27B: Gel de eletroforese demonstrando a extração do vetor TRBO na conformação de 2 bandas indicadas com a seta.

A qualidade das extrações foi verificada conforme item 4.4 apresentando valores adequados, nos quais a concentração foi de 384,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, a relação $A_{260/280}$ foi de 2,1 e a relação $A_{260/230}$ nm foi de 2,3. Sendo assim, prosseguimos para a digestão enzimática, realizada conforme item 4.4. Como pode ser observado na Figura 28, foi possível realizar a digestão enzimática do vetor TRBO com a enzima *AvrII*. No entanto, quando tentado realizar o corte em outra extremidade com a enzima *PacI*, não obteve-se sucesso. Foram testadas diversas variáveis, e seguidas as instruções de acordo com o fabricante. Foram testadas reações de corte com diferentes extrações de vetores, eluidos em água ou em TE (tampão de eluição constituído por tris-base e EDTA). Este último que inicialmente se pensou ser o agravante, já que o EDTA por ser um quelante de íons poderia estar atrapalhando o substrato contido no tampão para que a enzima agisse. No entanto, ao ser trocado o TE para eluição em água ultrapura livre de nucleases, ainda não foi possível realizar a digestão. Visto isso, acreditou-se que a enzima não estaria funcional. Sendo assim, foi feita a busca em departamentos da universidade que trabalham com enzimas de restrição, porém por se tratar de uma enzima específica e pouco utilizada, não foi encontrado outro exemplar da enzima. Infelizmente a falta de tempo hábil para aquisição de uma nova enzima impossibilitou que até o presente momento fosse feita a digestão do vetor

TRBO com a enzima *PacI*. Desta forma, optou-se por não realizar a digestão enzimática do inserto.



Figura 28: Gel de eletroforese demonstrando a digestão enzimática do vetor TRBO com a enzima de restrição *AvrII*. Onde, 1: controle da reação, contendo somente o vetor e o tampão utilizado para a enzima, sem ser feita a digestão enzimática; 2: vetor após a digestão enzimática.

6 Conclusões e perspectivas

Visto a importância econômica que o tungue e seu óleo apresentam, sobretudo para a região Sul do Brasil, e percebendo a importância da realização de estudos acerca do metabolismo lipídico de tungue é que se conclui este trabalho. Nele, foi possível entender melhor sobre a filogenia, organização, e interação de enzimas DGATs e FADs, em especial a DGAT2 e FADX de tungue, em comparação ainda com outras Euphorbiaceae, a mamona e o pinhão-manso.

Foi possível observar que as enzimas envolvidas no metabolismo lipídico de tungue, mamona e pinhão-manso, tem proximidade evolutiva de acordo com sua função e localização, demonstrando o papel da conservação de genes importantes para determinada especialidade nas plantas. Além disso, foi observado que as enzimas DGATs e FADs de tungue conservam alguns motivos de funções entre si o que demonstra que embora muito parecidas, não são idênticas e cada uma possui uma função e um papel a ser cumprido. Este fato pode ser visto também analisando o interatoma, onde cada enzima interage com proteínas diferentes.

Além disso, observou-se ser possível a extração do material genético (RNA e DNA) de tungue, tal como a amplificação por PCR do gene *VfDGAT2*. Foi possível também a extração do vetor viral TRBO seguido de sua digestão com a enzima de restrição *AvrII*. No entanto novas tentativas são necessárias para que seja possível a amplificação do gene *VfFADX*, e digestão com a enzima de restrição *PacI*.

Como perspectivas futuras, deseja-se prosseguir com a clonagem dos genes *VfDGAT2* e *VfFADX* para expressão transiente em tabaco. Para isso visamos, juntamente com o grupo de pesquisa, adquirir *primers* novos para amplificação do gene *VfFADX*, tal como a aquisição de uma nova *PacI* funcional.

7 Referências

ALMEIDA, I.R., et al. Zoneamento agroclimático da cultura do Tungue na Região Sul do Brasil. **Embrapa Clima Temperado Pelotas**, RS, Documento 358, ISSN 1516-8840, 2012.

ANDRIANOV, Vyacheslav et al. Tobacco as a production platform for biofuel: Overexpression of Arabidopsis DGAT and LEC2 genes increases accumulation and shifts the composition of lipids in green biomass. **Plant Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 277–287, 2010.

BLACKMON, G. H. THE TUNG-OIL INDUSTRY. **THE BOTANICAL REVIEW**. Vol. IX N.01. University of Florida Agricultural Experiment Station, Gainesville, 1943.

BRASILEIRO, Ana Cristina Miranda, et al. Manual de transformação genética de plantas 2.ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa Agropecuária Oeste; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2015.

BROWN, Karen; KEELER, William. The history of tung oil. **Wildland Weeds**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 4–24, 2005. Disponível em: <<http://plants.usda.gov/>>

CANÇADO, G. M. de A. et al. Cultivo de plantas in vitro e suas aplicações. **Informe Agropecuário**, [s. l.], v. 30 (253), n. January, p. 64–74, 2009.

CAO, Heping et al. Expression of tung tree diacylglycerol acyltransferase 1 in *E. coli*. **BMC Biotechnology**, [s. l.], v. 11, p. 1–13, 2011.

CAO, Heping et al. Expression and purification of recombinant tung tree diacylglycerol acyltransferase 2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 96, n. 3, p. 711–727, 2012.

CARELS, N. (2009). *Jatropha curcas*: A Review. *Adv Bot Res* 50, 39-86.

CHEN, Yi Cun et al. FAD2-DGAT2 genes coexpressed in endophytic *Aspergillus fumigatus* derived from tung oilseeds. **The Scientific World Journal**, [s. l.], v. 2012, 2012.

CHEN, Yicun et al. Effects of tung oilseed FAD2 and DGAT2 genes on unsaturated fatty acid accumulation in *Rhodotorula glutinis* and *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Genetics and Genomics**, [s. l.], v. 290, n. 4, p. 1605–1613, 2015.

CHRISTIE, W.W. The positional distributions of fatty acids in triglycerides. **The Analysis of Oils and Fats**, pp. 313-339, 1986.

CHOWDHURY, Biswanath; GARAI, Gautam. A review on multiple sequence

alignment from the perspective of genetic algorithm. **Genomics**, [s. l.], v. 109, n. 5–6, p. 419–431, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.06.007>>

CUI, Q. Q. et al. Expression analysis of VfDGAT2 in various tissues of the tung tree and in transgenic yeast. **Genetics and Molecular Research**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 6554–6564, 2013.

DAS, Kunal. et al. Novel Materials from Unsaturated Polyester Resin/Styrene/Tung Oil Blends with High Impact Strengths and Enhanced Mechanical Properties. **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 119, 2174–2182, 2011.

DUKE, J.A. (1983). Handbook of energy crops. Purdue: Purdue University, EUA. Disponível em: https://hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Aleurites_fordii.html. Acesso em: 15 de novembro de 2019.

DURRETT, Timothy P.; BENNING, Christoph; OHLROGGE, John. Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. **Plant Journal**, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 593–607, 2008.

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**, [s. l.], 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*). **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, [s. l.], v. 81, n. 7, p. 647–651, 2004.

DYER, John M.; MULLEN, Robert T. Engineering plant oils as high-value industrial feedstocks for biorefining: The need for underpinning cell biology research. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 132, n. 1, p. 11–22, 2008.

FAO, **Food and Agriculture Organization of The United Nations**. www.fao.org. Acesso em 10 de outubro de 2019.

GALLI, Vanessa et al. Transcriptome of tung tree mature seeds with an emphasis on lipid metabolism genes. **Tree Genetics and Genomes**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1353–1367, 2014.

HEEMANN, Fabiane. **O Cultivo do Fumo e Condições de Saúde e Segurança dos Trabalhadores Rurais**. Dissertação. UFRGS, 2009.

HUANG, Kun et al. Epoxy monomers derived from tung oil fatty acids and its

regulable thermosets cured in two synergistic ways. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 837–843, 2014.

HUNG, Jui Hung; WENG, Zhiping. Sequence alignment and homology search. **Cold Spring Harbor Protocols**, [s. l.], v. 2016, n. 11, p. 937–940, 2016.

IBGE, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. www.ibge.gov.br. Acesso em 10 outubro de 2019.

KOLESNIKOV, Y. S. et al. Molecular structure of phospholipase D and regulatory mechanisms of its activity in plant and animal cells. **Biochemistry (Moscow)**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 1–14, 2012.

KROON, Johan T. M. et al. Identification and functional expression of a type 2 acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) in developing castor bean seeds which has high homology to the major triglyceride biosynthetic enzyme of fungi and animals. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 67, n. 23, p. 2541–2549, 2006.

LI-BEISSON, Yonghua et al. Acyl-Lipid Metabolism. **The Arabidopsis Book**, [s. l.], v. 11, p. e0161, 2013.

LINDBO, John A. TRBO: A high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 145, n. 4, p. 1232–1240, 2007.

LIU, Meilan et al. Boosting C16 fatty acid biosynthesis of Escherichia coli, yeast and tobacco by tung tree (*Vernicia fordii* Hemsl.) beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase gene. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 127, n. July 2018, p. 46–54, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.067>>

MANAN, Sehrish et al. Transport and transcriptional regulation of oil production in plants. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 641–655, 2017.

MORTIMER, Cara L.; DUGDALE, Benjamin; DALE, James L. Updates in inducible transgene expression using viral vectors: From transient to stable expression. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 32, p. 85–92, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.009>>

PARK, Ji Yeon et al. Production and characterization of biodiesel from tung oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 148, n. 1–3, p. 109–117, 2008.

REN, Jing et al. Single nucleotide polymorphisms of fad2 gene from tung tree, *Vernicia fordii*, a potential biodiesel plant. **Euphytica**, [s. l.], v. 194, n. 1, p. 93–107,

2013.

SABINO DONATO, Virgínia Maria Tenório et al. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, [s. l.], v. 39, n. 11, p. 1087–1093, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001

SILVA, Sergio et al. Métodos de Propagação de Tungue (*Aleurites fordii*). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 1678- 2518, v. 187, p. 28. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2013.

SHOCKEY, Jay et al. **Tung (*Vernicia fordii* and *Vernicia montana*)**. [s.l.]: AOCS Press. Published by Elsevier Inc. All rights reserved., 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-893997-98-1.00010-5>>

SHOCKEY, Jay M. et al. Cloning, functional analysis, and subcellular localization of two isoforms of NADH:cytochrome b5 reductase from developing seeds of tung (*Vernicia fordii*). **Plant Science**, [s. l.], v. 169, n. 2, p. 375–385, 2005.

SMITH, C. R. Occurrence of unusual fatty acids in plants. **Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids**, [s. l.], v. 11, n. C, 1971.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596– 1599, 2007.

THEODOULOU, FL et al., Peroxisome membrane proteins: Multiple trafficking routes and multiple functions? **Biochemical Journal**, 451 (3). 345 – 352, 2013.

TZFIRA, Tzvi et al. Agrobacterium T-DNA integration: Molecules and models. **Trends in Genetics**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 375–383, 2004.

VAN ERP, Harrie et al. Reducing isozyme competition increases target fatty acid accumulation in seed triacylglycerols of transgenic Arabidopsis. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 168, n. 1, p. 36–46, 2015.

VANHERCKE, Thomas et al. Synergistic effect of WRI1 and DGAT1 coexpression on triacylglycerol biosynthesis in plants. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 587, n. 4, p. 364–369, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.12.018>

XU, Changcheng; SHANKLIN, John. Triacylglycerol Metabolism, Function, and Accumulation in Plant Vegetative Tissues. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 179–206, 2016.

YURCHENKO, Olga et al. Engineering the production of conjugated fatty acids in *Arabidopsis thaliana* leaves. **Plant Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 1010–1023, 2017.