

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE *VfFADX* e *VfDGAT2* em diferentes tecidos de Tungue (*Vernicia fordii*)

VITÓRIA HIRDES GLENZEL¹; GUSTAVO CAMOZZATO²; PEDRO LOPES REISSER²; ROSANE LOPES CRIZEL²; VANESSA GALLI³

¹Universidade Federal de Pelotas - CDTec, Biotecnologia - vitoriaglenzel@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – gustavocamozatto@gmail.com; reisser.pedro@gmail.com; rosanecrizel@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - CDTec, Biotecnologia – vane.galli@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A árvore de tungue (*Vernicia fordii*) é proveniente da China, e tem chamado atenção devido ao grande conteúdo de óleo que essa planta possui, podendo ser utilizada como biocombustível. Além disso, por possuir uma capacidade de secagem rápida, o óleo de tungue tem sido muito utilizado em vernizes, tintas, resinas, corantes e etc, por possuir em sua composição cerca de 75-80% de um ácido graxo poliinsaturado denominado ácido-alfa eleosteárico (SHOCKEY et al. 2016).

Alguns estudos têm abordado o papel de enzimas que estão relacionadas ao acúmulo de óleo nas sementes de tungue, dos quais, duas têm despertado a atenção. São elas a DGAT2 e a FADX (BUSS et al, 2013; GALLI et al. 2014). As enzimas DGAT catalisam a etapa final de acilação na via de biossíntese dos TAGs, transferindo um grupamento Acil, do Acil-CoA, para a posição 3 do diacilglicerol, formando o TAG (DYER et al. 2007). Já a enzima FADX é responsável por converter o ácido linoléico em ácido alfa-eleosteárico. Porém a ligação introduzida por ela na dessaturação de ácidos graxos é na configuração *trans*, e não *cis* como ocorre com outras dessaturases.

Uma vez que a clonagem dos genes que codificam para estas duas enzimas de tungue em *Arabidopsis thaliana* promoveu um aumento sinérgico no teor de óleo das folhas e no acúmulo de alfa-eleosteárico (YURCHENKO et al. 2017), nosso grupo percebeu a oportunidade de cloná-los em uma planta que possuísse características agrônômicas bem caracterizadas e que também tivesse significativa área foliar, como é o caso do tabaco (*Nicotiana tabacum*). Além disso, essa cultura não compete com culturas agrícolas alimentícias.

Com base nisso, foi que neste trabalho, teve-se o objetivo de avaliar o perfil de expressão dos genes *VfFADX* e *VfDGAT2* de tungue em diferentes tecidos, comparando com os resultados já obtidos no fruto maduro, além de amplificar estes genes para a futura clonagem em vetor viral e expressão destas proteínas em tabaco.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção das amostras biológicas

Cinco amostras de frutos maduros (100 dias após a floração - daf), flores femininas e masculinas, folhas e meristemas foliares foram obtidos de cinco árvores de tungue distintas, cultivadas na Sede da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, tendo recebido igual tratamento durante seu desenvolvimento. As flores foram dissecadas em pétalas, sépalas, gineceu (de flores femininas) e androceu (de flores masculinas), e as sementes retiradas dos frutos. Após este procedimento, todas as amostras foram imediatamente armazenadas a temperatura de -80 °C até o momento das análises.

2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

Todos os materiais foram previamente tratados com inibidor de RNase (RNase Away – Invitrogen™) para impedir a ação de RNases. As amostras congeladas foram maceradas com auxílio de nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído a partir de 0,1g destas amostras maceradas, segundo metodologia descrita por Messias et al. (2010). A qualidade do RNA extraído foi avaliada através de eletroforese utilizando gel de agarose 0,5%, enquanto que a concentração foi avaliada utilizando a técnica de fluorometria (QuBitRNA BR, Invitrogen™). A partir de 500ng de RNA total, foi realizada a digestão com 1U de DNase e 1 × DNase I Reaction Buffer (Invitrogen™), e posteriormente a síntese de cDNA com a enzima MMLV (Invitrogen™), conforme indicações do fabricante.

2.3 Desenho de *primers* e avaliação da expressão dos genes *VfFADX* e *VfDGAT2* por PCR em tempo real

Após serem sintetizados, os cDNAs foram amplificados por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real, utilizando *primers* específicos previamente testados quanto à eficiência e descritos em Galli et al. (2014), utilizando a metodologia descrita por estes mesmos autores. O gráfico de expressão relativa foi gerado pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

2.4 Desenho de *primers* e amplificação dos genes *VfFADX* e *VfDGAT2* por PCR convencional para clonagem em vetor viral

Para a clonagem destes genes em vetor viral TRBO (LINDBO, 2007) foram desenhados *primers* no programa Vector NT110 (Invitrogen™), através das sequências nucleotídicas obtidas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), acesso ABC94474.1 para a *VfDGAT2*, e acesso AAN87574.1 para *VfFADX*, incluindo nestes *primers* sítios de restrição para as enzimas *AvrII* e *PacI*. Para amplificação destas sequências, RNA de fruto maduro de tungue (100 dfa) foi isolado utilizando o reagente Plant RNA Isolation Reagent (Invitrogen™), de acordo com instruções do fabricante. A avaliação de qualidade e quantidade de RNA isolado, bem como a síntese de cDNA foram realizadas conforme item 2.3. Este cDNA foi utilizado em uma reação de PCR utilizando os *primers* desenhados e os reagentes do Kit GoTaq® Master Mixes (Promega™). O produto da PCR foi visualizado em gel de eletroforese 1% corado com Brometo de Etídio, juntamente com um marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder Fermentas) para confirmação do padrão de bandas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram que quando comparamos a expressão de ambos os genes (*VfDGAT2* e *VfFADX*) em frutos maduros de tungue e outros tecidos, a maior expressão ocorre em frutos maduros (Figura 1), sendo que o gene *VfFADX* é expresso apenas em frutos. 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 (BUSS et al, 2013; GALLI et al. 2014). Em conjunto, estes resultados demonstram que o papel dessas enzimas está intimamente ligado ao acúmulo de óleo nos frutos maduros.

Já havia sido reportado que a expressão de *VfDGAT2* em células de levedura resultou em um acúmulo elevado de TAGs em comparação com outra enzima DGAT, a DGAT1 (SHOCKEY et al. 2006). Além disso, foi demonstrado que a 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).

Em se tratando da FADX, já foi demonstrado seu papel no acúmulo de óleo na semente, importante reserva energética no momento da germinação (CAGLIARI et al., 2010). Além disso, a mesma demonstrou ter boa plasticidade enzimática, pois em um estudo com leveduras, demonstrou ser capaz de gerar uma variedade de produtos alternativos de ácidos graxos conjugados e dessaturados quando estas foram cultivadas na presença de substratos exógenos de ácidos graxos (DYER et al. 2015).

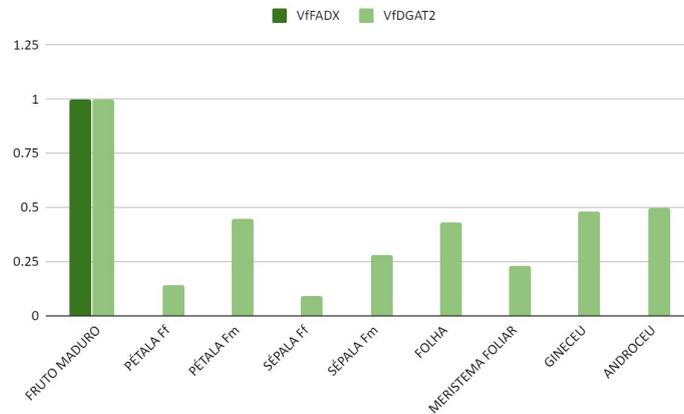


Figura 1. Níveis de expressão do genes *VfFADX* e *VfDGAT2* em diferentes tecidos de tungue. Sendo Fm; flores masculinas e Ff; flores femininas.

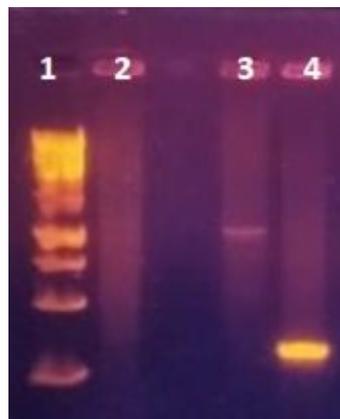


Figura 2. Resultado da eletroforese. Onde - 1. Marcador de peso molecular; 2. *VfFADX*; 3. *VfDGAT2*; 4. Gene endógeno utilizado como controle que codifica para a proteína Ubiquitina.

Em virtude do padrão de expressão observado para estes genes nas amostras analisadas, decidiu-se clonar esses genes em vetores virais. Na figura 3, pode ser observado o resultado da amplificação por PCR do gene *VfDGAT2* na canaleta número 3 do gel de agarose. Na canaleta de número 2 podemos observar que até o momento não foi possível ser feita a amplificação do gene que codifica para a enzima *VfFADX*, sendo necessários teste com novas amostras e outras condições de PCR a fim de que ocorra uma amplificação ideal.

Como perspectivas futuras, pretendemos inserir os genes em um vetor de expressão viral (TRBO) e cloná-lo em *Agrobacterium tumefaciens* para realização de agroinfiltração em folhas de tabaco, visando a expressão transiente destes genes e a indução da produção de ácido alfa eleosteárico neste tecido.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir então que quando comparamos a expressão dos genes *VfFADX* e *VfDGAT2* em frutos maduros e outros tecidos de tungue, a expressão se dá de forma acentuada nos frutos maduros, demonstrando assim o importante papel no acúmulo de óleo que esses genes efetuam. Visto isso, os mesmos têm potencial para serem utilizados em abordagens de engenharia genética. A amplificação do gene *VfDGAT2* foi realizada com sucesso, enquanto que padronizações são necessárias para a amplificação do gene *VfFADX*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BROWN K., et al. The History of Tung Oil. **Wildland Weeds** 9:4–24, 2005.
- BUSS, J.H.; GALLI, V.; LABONDE, J.; et al. EXPRESSÃO GÊNICA DE FAD2 E FADX AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE TUNGUE (*Vernicia fordii*) **CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, Pelotas, 2013.
- CAGLIARI, A.; PINHEIRO-MARGIS, M.; LOSS, G.; MASTROBERTI, A. A.; MARIATH, J. E. A.; MARGIS, R. Identification and expression analysis of castor bean (*Ricinus communis*) genes encoding enzymes from the triacylglycerol biosynthesis pathway. **Plant Science**, v.179, p.499–509, 2010.
- DYER J. M., et al. Engineering plant oils as high-value industrial feedstocks for biorefining: The need for underpinning cell biology research. **Physiologia Plantarum** 132(1):11-22, 2007.
- GALLI, Vanessa et al. Transcriptome of tung tree mature seeds with an emphasis on lipid metabolism genes. *Tree genetics & genomes*, v. 10, n. 5, p. 1353-1367, 2014.
- KROON JTM. 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. **Phytochem** 67:2541–2549, 2006.
- LINDBO, J. TRBO: A High-Efficiency Tobacco Mosaic Virus RNA-Based Overexpression Vector. **Plant Physiology**, 1104/pp.107.106377, 2007.
- LI-BEISSON Y, SHORROCH B, BEISSON F. ANDERSSON MX., ARONDEL V., BATES PD. BAUD S., BIRD D., DEBONO A., DURRETT TP., et al. Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book* 11:e0161, 2013.
- MESSIAS, R. S.; GALLI, V.; SILVA, S. D. A. et al. Metodologias de extração e avaliação semi quantitativa da expressão de genes de metabolismo secundário do milho (*Zea mays* L.). *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento: Embrapa Clima Temperado*, n. 117, p. 1-25, 2010.
- SHOCKEY, J. M.; GIDDA, S. K.; CHAPITAL, D. C. et al. Tung Tree DGAT1 and DGAT2 Have Nonredundant Functions in Triacylglycerol Biosynthesis and Are Localized to Different Subdomains of the Endoplasmic Reticulum. *The Plant Cell*, v. 18, p. 2294–2313, 2006.
- SHOCKEY, Jay et al. Tung (*Vernicia fordii* and *Vernicia montana*). *Industrial Oil Crops*. p. 243-273, 2016.
- YURCHENKO, O., et al. Engineering the production of conjugated fatty acids in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Biotechnology Journal*, 15, pp. 1010–1023. 2017.