



simpósio estadual de AGROENERGIA

IV reunião técnica de agroenergia - RS

EFICIÊNCIA DE PRIMERS RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO EM PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) PARA USO EM PCR EM TEMPO REAL

Joyce Moura Borowski¹; Vanessa Galli²; Julieti Buss³; Julia Labonde⁴; Rafael Messias⁵;
Sérgio Delmar Dos Anjos e Silva⁵

INTRODUÇÃO

Fontes alternativas de combustíveis, como o bioetanol e biodiesel, mostram-se promissoras para aliviar os problemas de aumento nos níveis de dióxido de carbono liberados na atmosfera, causados pelo consumo de combustíveis fósseis. O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) apresenta potencial para produção de biodiesel por apresentar teores consideráveis de óleo (até 40%), e ainda características agrônômicas importantes na qualidade do óleo produzido. Além disso, por não se tratar de uma cultura comestível, não compromete a segurança alimentar, e seu cultivo em solos degradados pode auxiliar no controle da erosão, não competindo por áreas destinadas à produção de alimentos (DIVAKARA et al., 2010; NATARAJAN & PARANI, 2011).

Incrementos na produtividade e qualidade do óleo das sementes de pinhão-mansos têm sido almejados, incluindo o aumento no conteúdo de óleo; o decréscimo no conteúdo de ácidos graxos insaturados (para aumentar a estabilidade oxidativa), de ácidos graxos livres (para impedir a formação de sabão e aumentar a produtividade de biodiesel), bem como de ácidos graxos de 18 carbonos (para reduzir a viscosidade para melhor atomização do biodiesel); a tolerância à seca; e a resistência a pestes e doenças (NATARAJAN & PARANI, 2011). Assim, a avaliação da expressão de genes envolvidos na rota metabólica de lipídeos contribuirá para o melhoramento genético vegetal e engenharia metabólica voltados para o aumento da produtividade e qualidade do óleo das sementes de pinhão manso.

A técnica de PCR em tempo real revolucionou o campo de análise de expressão gênica em organismos vivos, pois permite a quantificação dos *amplicons* a cada ciclo da reação usando fluorescência, com sensibilidade e especificidade (GACHON et al., 2004). No entanto, para usufruir destas vantagens e garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados de quantificação relativa, o método preconiza uma eficiência de amplificação da reação igual ou superior a 90% utilizando um dado conjunto de *primers*. Além disso, é de suma importância a normalização com genes endógenos (genes de referência ou *housekeeping*), os quais participam de processos celulares básicos e possuem um nível de expressão constante entre os diferentes tratamentos, órgãos e fases de desenvolvimento.





simpósio estadual de AGROENERGIA

IV reunião técnica de agroenergia - RS

Visando o estudo da expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico em pinhão manso, o trabalho objetivou verificar a eficiência de amplificação dos *primers* relacionados aos genes que codificam para ácido lisofosfatídico aciltransferase (LPAAT2), acil ACP tioesterase (FATA) e acil-CoA diacilglicerol aciltransferase (DGAT1), relacionados ao metabolismo lipídico, bem como genes endógenos que codificam para actina (ACT) e tubulina (TUB), buscando eficiências satisfatórias para o uso em PCR em tempo real.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de pinhão manso, cultivados na sede da Embrapa Clima Temperado (Pelotas/RS), foram coletadas, maceradas com auxílio de nitrogênio líquido, e imediatamente armazenados a -80°C até o momento das análises. A extração de RNA total das sementes foi realizada pelo método do CTAB com modificações (Messias et al., 2010), a qualidade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% e a concentração foi calculada por fluorometria (QuBit-RNA BR, InvitrogenTM). Aliquotas de $1\mu\text{g}$ de RNA total foram digeridas com 1U DNase e $1\times$ DNase I Reaction Buffer, e utilizadas para transcrição reversa com a enzima M-MLV, conforme fabricante (InvitrogenTM).

A eficiência de amplificação dos *primers* LPAAT2, FATA, DGAT1, ACT e TUB foi mensurada utilizando um termociclador modelo 7500 Fast (Applied Biosystems), realizando diluições seriadas de cDNA e plotando o Ct gerado (ciclo de PCR acima do background onde o amplicon é detectado) em função do logaritmo da concentração da amostra. O *slope* resultante da equação de regressão indica a eficiência da PCR, onde: $\text{Eficiência} = [10(-1/\text{slope})] - 1$. Concomitantemente, a curva de dissociação de cada *primer* foi avaliada a fim de verificar possíveis ampliações de fragmentos **inespecíficos** e estruturas secundárias formadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os *primers* avaliados foram amplificados com porcentagem de eficiência adequada para uso em PCR em tempo real, como mostra a tabela abaixo e a Figura 1, a qual apresenta a curva padrão gerada a partir dos dados de amplificação utilizando diluições seriadas de cDNA para cada par de *primer*. A presença de um único pico na curva de dissociação, sugerem que não ocorreram ampliações de fragmentos inespecíficos e formação de estruturas secundárias (Figura 2).



simpósio estadual de AGROENERGIA

IV reunião técnica de agroenergia - RS

Tabela 1. Eficiência de amplificação (%) de *primers* de pinhão manso relacionados ao metabolismo lipídico e genes endógenos.

<i>Primer</i>	Eficiência de amplificação
LPAAT2	108
FATA	103
DGAT1	100
ACT	111
TUB	107

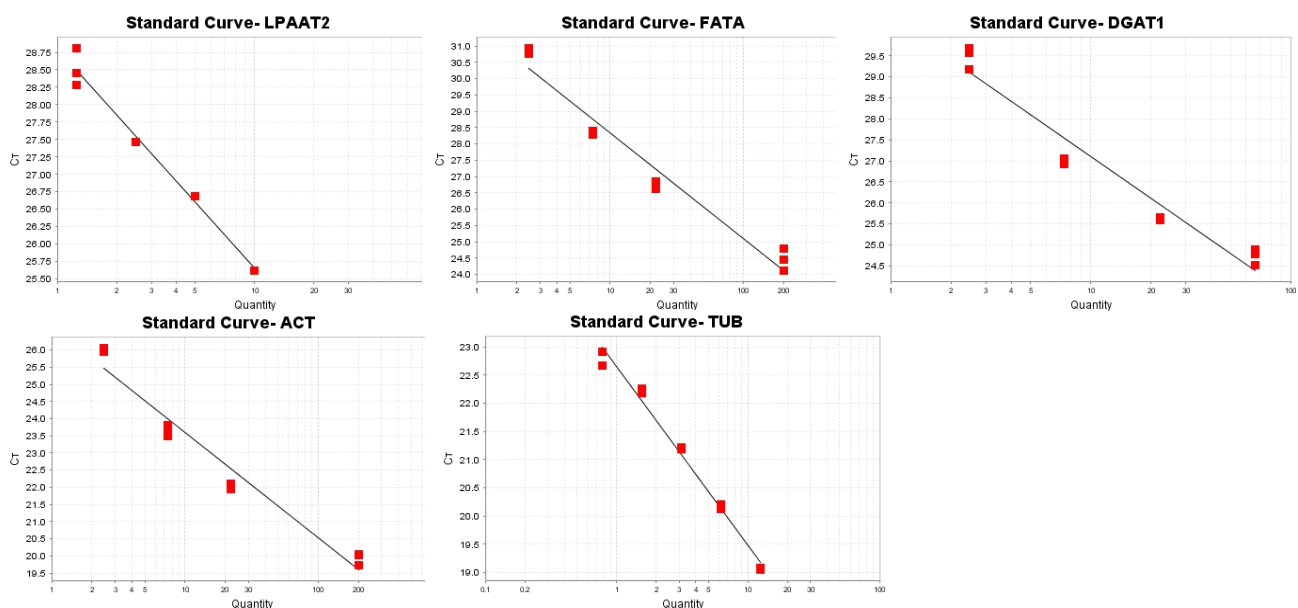


Figura 1. Curva padrão gerada a partir dos dados de Ct gerados utilizando diluição seriada de cDNA com cada par de *primers*.

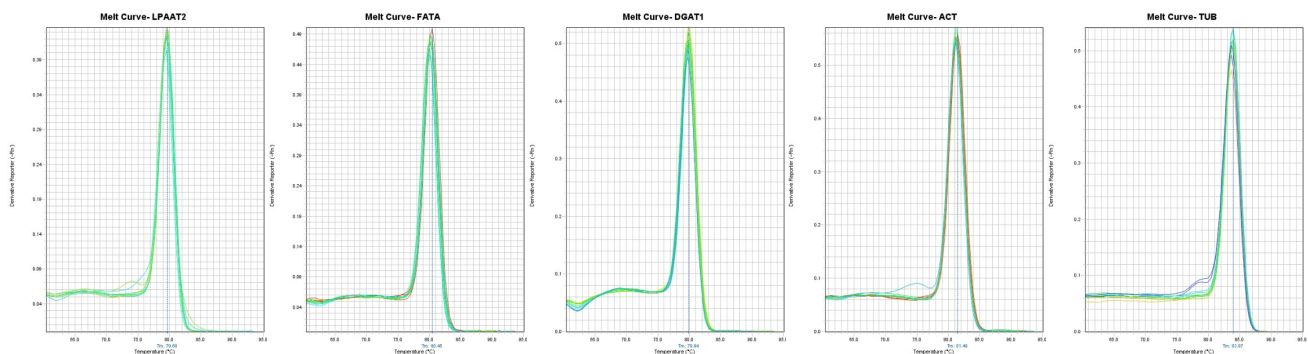


Figura 2. Curva de dissociação e curva padrão dos *primers* avaliados no presente estudo.

CONCLUSÃO



simpósio estadual de AGROENERGIA

IV reunião técnica de agroenergia - RS

Todos os *primers* avaliados apresentaram eficiência satisfatória e especificidade, permitindo sua utilização em análises confiáveis de expressão gênica por PCR em tempo real, utilizando amostras de pinhão manso.

BIBLIOGRAFIA

DIVAKARA, B. N.; UPADHYAYA, H. D.; WANI, S. P.; LAXMIPATHI GOWDA, C. L. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L. **Applied Energy**, 2010. v.87, p.732-742.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **J. Exp. Bot.** v. 55, p. 1445–1454, 2004.

MESSIAS, R. S.; GALLI, V.; SILVA, S. D. A.; SCHIRMER, M. A.; PILLON, C. N. Metodologias de extração e avaliação semi-quantitativa da expressão de genes de metabolismo secundário do milho. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. ISSN 1981-5980, 2010.

NATARAJAN, P.; PARANI, M. De novo assembly and transcriptome analysis of five major tissues of *Jatropha curcas* L. using GSFLX titanium platform of 454 pyrosequencing. **BMC Genomics**, 2011. v.12, n.191.