



## Análise de expressão de genes relacionados à biossíntese de lignina em sorgo

Poliana Pinto Ribeiro<sup>a</sup>, Beatriz de Almeida Barros<sup>b</sup>, Rafael Augusto da Costa Parrella<sup>b</sup>, Robert Eugene Schaffert<sup>b</sup>, Cynthia Maria Borges Damasceno<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Graduada em Ciências Biológicas/UNIFEMM; <sup>b</sup>Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo

E-mail: [cynthia@cnpms.embrapa.br](mailto:cynthia@cnpms.embrapa.br)

**Palavras Chave:** sorgo, etanol 2G, lignina, PCR em tempo real

### 1 - Introdução

O recente aumento da demanda por biocombustíveis tem impulsionado o desenvolvimento de novas tecnologias neste setor, como a produção do chamado etanol de segunda geração (2G) ou etanol lignocelulósico, que apresenta vantagens econômicas e ambientais. Neste processo, a celulose, principal componente da parede celular/biomassa, é convertida em açúcares simples para posterior fermentação em etanol.

Outro constituinte importante da parede celular é a lignina, um composto polifenólico, cujas características podem interferir negativamente com a produção do etanol 2G. Assim, a obtenção de materiais que apresentem menores teores de lignina tornará o processo mais eficiente e economicamente mais viável.

Dentre as culturas com maior potencial para serem utilizadas na produção de etanol 2G está o sorgo (*Sorghum bicolor*), que além de possuir tolerância a vários estresses bióticos e abióticos, também possui materiais que apresentam alta produção de biomassa. Outra vantagem da utilização de sorgo como cultura energética é a existência de mutantes para lignina, como os mutantes nervura marrom (*brown midrib* ou *bmr*), que podem apresentar até 50% menos lignina que o material não-mutante correspondente.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo identificar genótipos com expressão diferenciada dos genes relacionados à síntese de lignina em sorgo analisando-se a expressão gênica por PCR em tempo real (RT-qPCR) com detecção SYBR<sup>®</sup> Green. O desenvolvimento de materiais vegetais que possuam composição da parede celular diferenciada para aumento da eficiência da produção de etanol 2G constitui uma estratégia para manter a posição de destaque do Brasil como produtor mundial de etanol.

### 2 - Material e Métodos

Foram utilizados 31 genótipos de sorgo, dos quais 15 pertencem à coleção núcleo do CIRAD (*Centre de Cooperation Internationale em Recherche Agronomique*

*pour Le Developpement* – França) e apresentam variabilidade conhecida para o teor de lignina. Os demais genótipos pertencem ao programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, e apresentam ou não o gene mutante *bmr-6*, o qual corresponde ao que codifica a enzima CAD da via biossintética da lignina.

Após 15 dias de plantio em casa de vegetação, amostras para análise de expressão gênica foram coletadas. O RNA total foi extraído dos colmos, sendo posteriormente tratado com DNase para síntese de cDNA. A expressão gênica foi avaliada por meio de RT-PCR quantitativo em tempo real no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), com três repetições, utilizando detecção por SYBR<sup>®</sup> Green.

Primers específicos foram desenhados para cada gene correspondente às 10 enzimas da via biossintética da lignina, baseado em dados de literatura e homologia de sequência, utilizando-se buscas no genoma do sorgo. Para diferenciar entre a amplificação resultante do cDNA sintetizado ou do DNA genômico residual, os pares de primers foram desenhados de forma que flanqueiem introns, sempre que possível. A eficiência da reação para cada par de primer foi calculada utilizando-se uma curva padrão obtida a partir de diluições seriadas de um cDNA controle. Apenas primers apresentando mais de 90% de eficiência de amplificação foram utilizados na análise final. Para efeitos de normalização, a expressão endógena foi monitorada com primers para o gene do fator de alongação *SbeIF4a1* de sorgo (Sattler *et al.*, 2009). Os dados foram analisados pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak; Schmittgen, 2001) para cálculo do valor RQ (quantificação relativa).

Diferenças significativas de expressão gênica foram analisadas pelo método da Diferença Mínima Significativa (LSD) utilizando o pacote estatístico do programa SISVAR (Ferreira, 2008).

### 3 - Resultados e Discussão

A fim de melhor entender a via biossintética da lignina em sorgo e identificar materiais com expressão diferenciada dos genes relacionados à síntese de lignina, primers específicos para os genes de interesse foram utilizados em análise de RT-qPCR (método de detecção SYBR<sup>®</sup> Green) em 31 genótipos distintos de sorgo (Tabela



# VII Encontro da Rede de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Biocombustíveis de Minas Gerais

1). As mudanças em fluorescência do SYBR<sup>®</sup> Green I dye foram monitoradas em cada ciclo pelo programa do sistema ABI 5700 e o ciclo *threshold* ( $C_T$ ) para cada reação foi calculado. Os pares de primers utilizados foram os que apresentaram eficiência de reação maior que 90% e correspondem às enzimas: *C3H-1*, *Bmr6qTR* (*CAD*), *COMT-2*, *CCoAOMT*, *C4H*, *F5H-1*, *F5H-2*, *PAL*, *HCT-1*, *HCT-2* e *CCR*.

Tabela 1: Genótipos de sorgo utilizados no trabalho.

CIRAD		Embrapa	
G1	G9	G17	G29
G2	G10	G18 ( <i>bmr-6</i> )	G30 ( <i>bmr-6</i> )
G3	G11	G21	G31
G4	G12	G22 ( <i>bmr-6</i> )	G32 ( <i>bmr-6</i> )
G5	G13	G23	G33
G6	G15	G24 ( <i>bmr-6</i> )	G34 ( <i>bmr-6</i> )
G7	G16	G27	G35
G8		G28 ( <i>bmr-6</i> )	G36 ( <i>bmr-6</i> )

Os resultados obtidos indicam que existe considerável variabilidade para expressão dos genes relacionados à síntese de lignina entre os genótipos de sorgo analisados. Os genótipos que pertencem à coleção núcleo do CIRAD apresentaram, em geral, menor expressão do gene *C3H-1* quando comparados aos que pertencem ao programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo (Figura 1). Três dos oito genótipos que possuem o gene mutante *bmr-6* (G18, G24 e G32) apresentam menor expressão do gene *C3H-1* em relação ao seu respectivo genótipo de origem (G17, G23 e G31), indicando que mesmo sendo a mutação do gene *bmr-6* relativa apenas ao gene que codifica a enzima CAD, parece existir uma co-regulação dos demais genes da via. Esse efeito parece ser dependente do *background* genético uma vez que nem todos os genótipos com *bmr-6* apresentaram expressão diferenciada em relação ao genótipo sem o gene mutante.

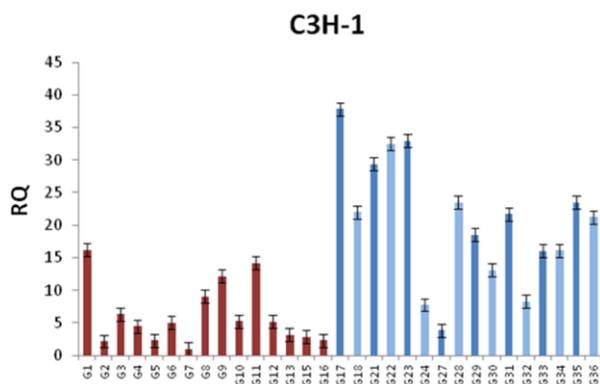


Figura 1: Análise de expressão gênica relativa (RQ) por RT-qPCR com detecção SYBR Green. Genótipos G1-G16 (CIRAD) e G17-G36 (Embrapa Milho e Sorgo). Calibrador: genótipo 7.

Os demais genes analisados apresentaram grande variabilidade de expressão, além da mesma tendência de se observar menores valores de expressão com materiais da coleção núcleo do CIRAD, bem como influência de *background* genético nos materiais *bmr-6*.

Em geral, os genótipos que pertencem à coleção núcleo do CIRAD apresentam maior variabilidade de expressão dos genes do que os que pertencem ao programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo. Isso é de se esperar uma vez que os materiais da coleção do CIRAD são bastante diversos geneticamente.

Modificações na atividade das enzimas presentes na via biossintética da lignina, alteram o conteúdo de lignina na parede celular. Como exemplo, a regulação negativa da atividade das enzimas HCT e C3H que atuam no início da via é a mais eficiente para reduzir o teor de lignina. Chen e Dixon (2007) demonstraram que a regulação negativa destes genes foi mais eficaz em reduzir o teor de lignina em plantas de alfafa transgênicas para os mesmos, do que a regulação negativa de genes cujas proteínas atuam posteriormente na rota, demonstrando a importância dos mesmos para síntese de lignina.

Estes trabalhos demonstram que a manipulação genética da via biossintética da lignina pode auxiliar no desenvolvimento de genótipos de sorgo que apresentem composição de parede mais adequada para produção de etanol 2G. Portanto, o melhor entendimento da via poderá auxiliar no desenvolvimento de marcadores moleculares a serem utilizados em programas de melhoramento de sorgo para seleção de materiais com menores níveis de lignina.

## 4 - Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa Milho e Sorgo por recursos financeiros e infraestrutura, bem como à FAPEMIG (APQ-00207-09 - 'Núcleo Integrado De Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação de Biocombustíveis, em Minas Gerais) e ao PIBIT/CNPq por concessão de bolsa a Poliana P. Ribeiro.

## 5 - Bibliografia

- Sattler, S. E. et al. A nonsense mutation in a Cinnamyl alcohol dehydrogenase gene is responsible for the sorghum brown midrib 6 phenotype. *Plant Physiology*, v. 150, p. 584-595, 2009.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Method*, v. 25, p. 402-408, 2001.
- Ferreira, D. F. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium* (Lavras), v. 6, p. 36-41, 2008.
- Chen, F.; Dixon, R. A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnology*, New York, v. 25, p. 759-761, 2007.