

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**DANYELLE BARBOSA MAYRINK**

**Perfil de expressão de dessaturases em sementes  
de soja e avaliação da atividade enzimática do alelo  
mutante *GmFAD3A* da variedade CS303TNKCA**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2017**

**DANYELLE BARBOSA MAYRINK**

**Perfil de expressão de dessaturases em sementes de soja e  
avaliação da atividade enzimática do alelo mutante *GmFAD3A* da  
variedade CS303TNKCA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal de Viçosa como parte das  
exigências para a obtenção do título de Engenheiro  
Agrônomo. Modalidade: trabalho científico.

Orientador: Prof. Dr. Maximiller Dal-Bianco L. Costa

Coorientadores: Dr. Luiz Cláudio Costa Silva

Dr. Rafael Delmond Bueno

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

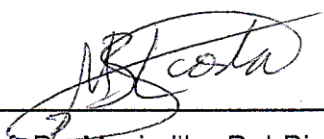
**2017**

**DANYELLE BARBOSA MAYRINK**

**Perfil de expressão de dessaturases em sementes de soja e  
avaliação da atividade enzimática do alelo mutante *GmFAD3A* da  
variedade CS303TNKCA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal de Viçosa como parte das  
exigências para a obtenção do título de  
Engenheiro Agrônomo. Modalidade: Trabalho  
científico.

Aprovado em: 20 de Outubro de 2017



---

Prof. Dr. Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

*Aos meus pais Antônio e Efigênia,  
pelo exemplo de vida e apoio incondicional,*

*Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por esta incrível oportunidade e conquista, por ter me dado forças para superar os momentos mais difíceis, iluminado e guiado meus passos durante todo este tempo.

Aos meus pais, Antônio e Efigênia, por serem exemplo de vida, pela dedicação com que me criaram, pelo amor que depositaram em mim, pelas palavras certas quando tudo parecia desabar, pelo incentivo e por me permitirem realizar este sonho, mesmo longe. Tento ser uma pessoa melhor a cada dia, pois em vocês me espelho. Esta conquista é para vocês.

Aos meus irmãos, em especial aos que permaneceram perto dos meus pais e fazem por eles o que eu não posso.

A minha irmã Mônica, por cuidar com tanto carinho e zelo dos meus pais. A minha irmã Elisângela, por ser exemplo de mulher, esposa, mãe, estudante e dedicação ao trabalho.

Aos meus sobrinhos, por serem carinhosos e encherem meus dias de alegria, e em especial a minha sobrinha Yochabell por ser sempre a amiga que eu precisei.

Ao meu namorado Flaviano, meu eterno amigo, pelo amor, apoio, incentivo, paciência e carinho, por todos os momentos que dividimos, por estar presente mesmo quando longe, por ser um porto seguro e pela paz que me traz.

Aos meus sogros, Flávio e Silmara, e a Vó Maria por todo carinho que têm por mim.

A Paula Meireles, pela amizade e companheirismo, pelos melhores momentos da graduação e pela terra das hortênsias.

A Marina, que em pouco tempo de convívio tem se tornado tão companheira e amiga, por todas as risadas, casos e por tornar o horário de trabalho tão divertido.

Ao professor João Martins, por acreditar em mim e ser impulso nos meus estudos, e a todos do NEPJM pela amizade e companheirismo nos anos de cursinho.

As minhas primas Lúcia, Gleiciane e Cristiane por me acolherem em Viçosa e fazer com que me sentisse em família.

Ao meu orientador, professor Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa, pelo exemplo de ética como pesquisador, pelos princípios, ensinamentos, oportunidade de trabalho, paciência, compreensão e confiança, pelos conselhos e amizade.

A todos do Laboratório de Genética Molecular de Plantas do BIOAGRO, alunos e ex-alunos, pelos bons momentos e por contribuírem com esse trabalho. Em especial, ao Pedro

Scarpelli e Isadora Prata que me deram oportunidade de trabalhar com eles, e ao Zé Dias pelo pouco tempo de convívio e grande amizade.

Aos meus coorientadores Rafael e Luiz Cláudio pelo aprendizado e ao pesquisador Newton Deniz Piovesan pela dedicação em todos os nossos projetos.

Ao CNPq e FAPEMIG pelas bolsas de Iniciação Científica

A Caramuru Alimentos, Bokada, AproSoja, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

A Universidade Federal de Viçosa, a mais linda das federais, pela infraestrutura e oportunidade de aprender com profissionais de qualidade em um ambiente único.

A todos que de alguma forma fizeram parte da minha formação pessoal e acadêmica,

A minha gratidão.

## RESUMO

A soja é a leguminosa cujo cultivo teve maior crescimento em todo o mundo nas últimas décadas, por apresentar características interessantes para a indústria, além de alta produtividade e baixo custo de produção. No Brasil, a cultura representa cerca de 56% da área plantada em grãos e no último ano obteve uma receita de US\$19,3 bilhões de dólares proveniente da exportação. A fração óleo do grão de soja, constituída por triacilgliceróis, corresponde a 20% da sua composição, sendo os principais: ácido palmítico (16:0) – 13%, ácido esteárico (18:0) – 4%, ácido oleico (18:1  $\Delta^9$ ) – 18%, ácido linoleico (18:2  $\Delta^{9,12}$ ) – 55% e ácido linolênico (18:3  $\Delta^{9,12,15}$ ) – 10%. O teor dos ácidos graxos oleico, linoleico e linolênico no grão de soja é uma característica quantitativa regida pelos genes *GmFAD2* e *GmFAD3*, que codificam para as enzimas  $\omega$ -6-dessaturase e  $\omega$ -3-dessaturase, respectivamente. O entendimento do padrão de expressão destes genes, bem como o efeito de mutações sobre estes níveis de expressão e sobre a atividade das dessaturases é de grande interesse para o melhoramento de soja, visando melhorar a composição do óleo. Para tal, é importante identificar os melhores controles endógenos para a normalização dos dados de expressão destes genes. O objetivo deste trabalho foi identificar controles endógenos, quantificar a expressão dos genes *GmFAD2* e *GmFAD3* pela metodologia de PCR em tempo real (qRT-PCR) e avaliar a atividade da enzima  $\omega$ -3-dessaturase por meio da expressão heteróloga do *GmFAD3A* da variedade CS303TNKCA, mutante para este gene. Para a análise de expressão gênica, foram testados 15 conjuntos de primers para genes descritos como controles endógenos na soja, e por fim foram selecionados apenas dois, UKN2 e CONST7. Foi constatado que os genes *GmFAD2* são mais expressos que os genes *GmFAD3* e que a expressão do gene *GmFAD2-1A* foi menor em plantas contendo mutação neste gene proveniente da linhagem PI603452. Para a análise da atividade enzimática, leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foram transformadas com vetores pYES2 clonados com gene *GmFAD3A* selvagem e mutante e com vetores não clonados. Após período de incubação, o perfil de ácidos graxos das colônias de leveduras foi analisado por cromatografia gasosa, onde concluímos que o gene *GmFAD3A* contendo a mutação da CS303TNKCA acarreta a codificação de uma proteína inativa, que explica seu baixo teor de ácido linolênico. Estes são dados importantes para o melhor entendimento da biossíntese de ácidos graxos no grão de soja, auxiliando programas de melhoramento na seleção de variedades com alto teor de ácido oleico e baixo teor de ácido linolênico.

## ABSTRACT

Soybean is a legume whose cultivation has grown worldwide in the last decades and presents good characteristics for agroindustry, besides high productivity and low production cost. In Brazil, the crop accounts for 56% of grain planted area and U\$ 19.3 billion in export revenue. The soybean oil consist of triacylglycerols, corresponds to 20% of seed composition splitting in: palmitic acid (16:0) - 13%, stearic acid (18:0) - 4%, oleic acid (18:1  $\Delta^9$ ) - 18%, linoleic acid (18:2  $\Delta^{9,12}$ ) - 55% and linolenic acid (18:3  $\Delta^{9,12,15}$ ) - 10%. The content of oleic, linoleic and linolenic acids is a quantitative trait governed by *GmFAD2* and *GmFAD3* genes, which encode  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3-desaturase enzymes, respectively. Understanding the expression pattern of these genes, as well the effect of the mutation on expression levels and desaturases activity is a great interest in soybean breeding, aiming to improve oil composition. For this, it is important to identify the best endogenous controls to normalize gene expression. The main goal of this work was to identify endogenous controls, quantify the expression level of *GmFAD2* and *GmFAD3* genes by real-time PCR (qRT-PCR) and evaluate  $\omega$ -3-desaturase enzyme activity by heterologous expression of *GmFAD3A* from CS303TNKCA cultivar, mutant for this gene. For gene expression analysis, fifteen sets of primers were tested as endogenous controls, and we selected two, UKN2 and CONS7. It was found that *GmFAD2* genes are more expressed than *GmFAD3* genes, and *GmFAD2-1A* gene expression was lower in plants containing a mutation in this gene derived from line PI603452. For enzymatic activity analysis, yeasts *Saccharomyces cerevisiae* were transformed with pYES2 vectors cloned with wild, mutant and uncloned *GmFAD3A* vectors. After an incubation period, the yeast fatty acid profile was analyzed by gas chromatography, and we conclude that *GmFAD3A* gene found in CS303TNKCA mutation codes an inactive protein, which explains its low linolenic acid content. These are important data for a better understanding of fatty acid biosynthesis in soybean, aiding breeding programs in the selection of varieties with a high content of oleic acid and low content of linolenic acid.



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1) Material genético .....	14
3.2) Extração de RNA .....	14
3.3) Análise de genes para qRT-PCR.....	14
3.4) Análise da atividade enzimática .....	18
3.4.1) Síntese das sequências e clonagem dos vetores.....	18
3.4.2) Transformação de Escherichia coli .....	19
3.4.3) Extração de DNA plasmidial .....	19
3.4.4) Transformação de Saccharomyces cerevisiae.....	20
3.4.5) Extração de ácidos graxos.....	20
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
4.1) Análise da integridade do RNA .....	22
4.2) Análise da expressão gênica .....	22
4.2.1) Avaliação da variação de expressão nos controles endógenos selecionados..	22
4.2.2) Determinação do número ótimo de genes.....	24
4.2.3) Seleção dos genes mais estáveis .....	24
4.2.4) Análise da expressão gênica das dessaturase.....	27
4.3) Análise de atividade enzimática .....	29
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>33</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>34</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>35</b>

# 1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é a cultura agrícola que mais cresceu nas últimas décadas e é também a leguminosa mais cultivada no mundo. Além de características agronômicas favoráveis ao cultivo, como alta produtividade e baixo custo de produção, a soja tem em seus grãos altos teores de óleo e proteína, ambos importante matéria prima para a indústria alimentícia e do biodiesel. Por tais características, a soja hoje se caracteriza como uma das *commodities* de maior liquidez na economia mundial.

A soja no Brasil representa cerca de 56% da área plantada em grãos e no cenário mundial tem destaque por ocupar a colocação de segundo maior produtor, o que contabiliza cerca de um terço da produção mundial. Cultivada comercialmente em território nacional desde a década de 50, a área ocupada pela leguminosa na safra 2016/2017 foi de aproximadamente 34 milhões de hectares e obteve uma produção de 114 milhões de toneladas, sendo o Mato Grosso o principal estado produtor do país (CONAB, 2017).

Em 2016, o Brasil transformou 39 milhões de toneladas de soja para a produção de 7,75 milhões de toneladas de óleo e 29,6 milhões de toneladas de farelo, competindo com a produtividade de carnes, ovos e leite. No último ano, a ABIOVE registrou exportação de 51,58 milhões de toneladas de grãos e uma receita de US\$19,3 bilhões de dólares (Formigoni, 2017), e projeta para o ano de 2017 crescimento de 13,8% nas exportações (ABIOVE, 2017).

A fração de óleo do grão de soja é composta por cinco ácidos graxos principais: ácido palmítico (16:0) – 13%, ácido esteárico (18:0) – 4%, ácido oleico (18:1  $\Delta^9$ ) – 18%, ácido linoleico (18:2  $\Delta^{9,12}$ ) – 55% e ácido linolênico (18:3  $\Delta^{9,12,15}$ ) – 10%. Estes óleos são amplamente utilizados na indústria alimentícia para produção de gordura vegetal, margarina, óleo de cozinha, maionese e derivados. Além de contribuir para a indústria alimentícia, o óleo de soja pode ser utilizado para a produção de biocombustível. Conforme a Lei nº 13.263 de 23 de março de 2016, todo óleo diesel comercializado no Brasil deve possuir 10% de biodiesel até março de 2019 (BRASIL, 2016). Em 2016, a produção nacional de biodiesel alcançou 3,8 bilhões de litros, enquanto o volume de óleo de soja usado para fabricar o biocombustível atingiu 3,02 bilhões de litros (ANP, 2017).

Dos ácidos graxos que constituem os grãos de soja, o ácido linolênico é o mais abundante na maioria dos tecidos vegetais enquanto o ácido linoleico é observado em maiores concentrações nos tecidos de reserva de sementes. A qualidade do óleo, com relação a durabilidade, sabor e odor está diretamente ligada à sua composição. Quanto maior o número de insaturações contidas na cadeia carbônica do ácido graxo mais vulnerável à degradação ele é, tanto pela ação de enzimas oxidativas, quanto pela degradação por fatores externos, como luz, umidade e temperatura, podendo levar a formação de ácidos carboxílicos, cetonas e peróxidos que afetam a qualidade do produto e podem acarretar sérios danos econômicos (Alonso e Maroto, 2000).

A concentração de ácido oleico na semente de soja é uma característica quantitativa regida pelos genes *GmFAD2-1*, *GmFAD2-2* e *GmFAD2-3*. Estes genes codificam para as enzimas  $\omega$ -6-dessaturases responsáveis pela conversão do ácido oleico a linoleico adicionando uma insaturação a cadeia carbônica. Para o gene *GmFAD2-1* foram encontradas duas isoformas denominadas *GmFAD2-1A* (localizado no cromossomo 10) e *GmFAD2-1B* (localizado no cromossomo 20), que são mais expressos nas sementes em desenvolvimento (Tang et al., 2005; Schlueter et al., 2007) e, portanto, de maior importância para os programas de melhoramento que visam o aumento de ácido oleico em grãos de soja. Para o gene *GmFAD2-2* foram encontradas três isoformas: *GmFAD2-2A*, *GmFAD2-2B* e *GmFAD2-2C*, que são expressos constitutivamente em todos os tecidos e codificam para enzimas  $\omega$ -6-dessaturases responsáveis pela produção de lipídios de membrana (Schlueter et al., 2007; Tang et al., 2005). O *GmFAD2-2A* e *GmFAD2-2B* estão localizados bem próximos e encontram-se no cromossomo 19, enquanto o *GmFAD2-2C* encontra-se no cromossomo 3 (Schlueter et al., 2007). O *GmFAD2-3* é expresso em tecidos vegetativos e sementes em desenvolvimento (Li et al., 2007). Além destes, há ainda o gene *GmFAD3* cujas isoformas *GmFAD3A*, *GmFAD3B* e *GmFAD3C* se encontram no cromossomo 14, cromossomo 2 e cromossomo 18, respectivamente, e codificam as enzimas  $\omega$ -3-dessaturases que catalisam a reação de adição de uma insaturação à cadeia carbônica do ácido linoleico (Baud e Lepiniec, 2010) tendo como produto o ácido linolênico, que apesar da sua importância tem características físicas e químicas que podem trazer qualidades indesejáveis ao mercado.

Alguns genes são expressos em quantidades constantes independente das condições edafoclimáticas as quais a planta é submetida e são utilizados como controles endógenos para análise da expressão de genes de interesse em um organismo. Para a soja, foram descritos

diversos genes e seus respectivos *primers* publicados em artigos, os quais foram utilizados no presente trabalho (Van de Mortel et al. 2007, Libault et al. 2008, Hu et al. 2009, Le et al. 2012, Li, Q. et al. 2012, Miranda et al. 2013). O teor de ácidos graxos nos grãos e em toda planta podem ser explicados pela expressão dos genes responsáveis pela sua síntese, e a quantificação do mRNA, utilizado para a tradução da proteína, mostra a proporção em que este gene está sendo expresso e pode ser relacionado ao seu produto correspondente.

Apesar de apresentar genes de expressão constante, a maioria dos genes de organismos vivos são expressos de forma diferenciada com base na necessidade das proteínas que eles codificam. Mutações nesses genes podem levar a alterações drásticas na sequência de aminoácidos que codificam causando, por exemplo, a inativação da enzima ou alteração da sua atividade catalítica, sendo capazes de gerar organismos com fenótipo diferente dos seus antecessores (Zaha, 2003). Para analisar as alterações geradas por essas mutações, atualmente tem sido utilizada a técnica de expressão heteróloga, que consiste em expressar um gene ou parte dele em um organismo hospedeiro que não o possui por meio de transformação genética utilizando DNA recombinante, e desta forma avaliar as características desejadas no organismo transformado. Em soja, para estudos de características relacionadas a composição do óleo, tem sido utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* que em condições normais não produz ácidos graxos poli-insaturados por não possuir as enzimas  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 dessaturases (Tang et al. 2005, Zhang et al. 2009, Shi et al. 2012, Sun et al. 2016). Nos programas de melhoramento vegetal, mutações que associam características fenotípicas relevantes são de grande interesse, pois podem agregar atributos agrônomicos significativos às plantas e de alto valor econômico.

No presente trabalho, foram extraídas amostras de RNA de genótipos com características fenotípicas interessantes para a agroindústria para proceder-se a quantificação da expressão de genes em linhagens contrastantes para o teor de óleo, proteína e composição de ácidos graxos pela metodologia de PCR em tempo real (qRT-PCR). Além disto, realizamos a avaliação da atividade enzimática do gene *GmFAD3A* da variedade CS303TNKCA por expressão heteróloga na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O trabalho permitiu selecionar controles endógenos para serem aplicados nesta situação, identificou diferenças na expressão gênica entre variedades contrastantes para o teor de óleo, proteína e composição de ácidos graxos, além de validar uma mutação encontrada na variedade CS303TNKCA.

## 2. OBJETIVOS

- 1) Identificar controles endógenos para serem utilizados em plantas de soja contrastantes para o teor de proteína, óleo e composição de ácidos graxos;
- 2) Determinar o nível de expressão dos transcritos dos genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos mono (*GmFAD2-1A* e *GmFAD2-1B*) e poli-insaturados (*GmFAD3A*, *GmFAD3B* e *GmFAD3C*), em genótipos mutantes e selvagens pela metodologia de PCR em tempo real (qRT-PCR);
- 3) Analisar a atividade da enzima  $\omega$ -3-dessaturase codificada pelo gene *GmFAD3A* da variedade CS303TNKCA pela metodologia de expressão heteróloga do gene na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1) Material genético

Foram selecionados 13 genótipos que contém características agrônômicas relevantes, entre eles selvagens e mutantes para os genes *GmFAD2* e *GmFAD3*, para se proceder a extração do RNA total. O material genético encontra-se descrito na Tabela 1.

#### 3.2) Extração de RNA

Foram coletadas sementes no estágio R6 de desenvolvimento e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em freezer - 80°C e em seguida procedeu-se a extração do RNA total das sementes utilizando reagente Trizol® (Invitrogen), sendo três réplicas de cada genótipo selecionado (Tabela 1). Após a extração, a quantificação foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. A qualidade do RNA foi verificada pela integridade de bandas em gel de agarose 1,7%. Após eletroforese, o RNA foi tratado com DNase I RNase Free (Invitrogen), e novamente quantificadas em aparelho fluorímetro SpectraMax M5 Microplate Reader (Molecular Devices) utilizando kit RiboGreen (Molecular Devices), para obtenção dos valores de concentração mais precisos. Posteriormente as amostras de RNA foram submetidas a reação com Transcriptase Reversa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) utilizando primer Oligo (dT)12-18 (Sigma Aldrich, São Paulo, SP) para a síntese da fita de cDNA, que corresponde ao DNA complementar ao RNA mensageiro.

#### 3.3) Análise de genes para qRT-PCR

Para a obtenção de controles endógenos utilizados no experimento, foi feita uma busca na literatura para os controles já utilizados e validados em soja (Van de Mortel et al. 2007; Libault et al. 2008; Hu et al. 2009; Le et al. 2012; Li, Q. et al. 2012; Miranda et al. 2013), descritos na Tabela 2. Estes controles foram utilizados para testes em nossas amostras e verificação de sua expressão estável.

Tabela 1: Material genético selecionado com base em características interessantes para o programa de melhoramento.

Linhagem	Característica	Composição do óleo (%)					Gene Mutante
		Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolênico	
<b>A29</b>	Baixo linolênico	11,01	4,07	21,72	62,03	1,19	<i>GmFAD3A, GmFAD3B, GmFAD3C</i>
<b>CS303TNKCA</b>	Baixo linolênico	11,25	3,57	20,49	60,92	3,78	<i>GmFAD3</i>
<b>FA22</b>	Médio oleico	8,56	2,88	49,23	33,80	5,56	-
<b>PI 603452</b>	Médio oleico	10,68	2,92	33,39	44,43	8,58	<i>GmFAD2-1A</i>
<b>PI 283327</b>	Médio oleico	10,64	3,88	28,97	45,24	11,27	<i>GmFAD2-1B</i>
<b>BARC8</b>	Alta proteína	10,48	4,02	18,62	58,96	7,92	-
<b>BR80</b>	Alta proteína	11,68	3,00	12,77	60,87	11,69	-
<b>NT12</b>	Alta proteína	10,55	3,19	18,71	58,49	9,06	-
<b>CD01 RR</b>	Alto óleo	11,67	3,89	19,20	58,39	6,84	-
<b>SUPREMA</b>	Alto óleo	10,23	3,42	20,14	58,20	8,02	-
<b>PL04*</b>	Alto oleico	6,25	3,25	84,94	1,94	3,63	<i>GmFAD2-1A e GmFAD2-1B</i>
<b>PL21*</b>	Alto oleico	6,37	3,51	85,65	1,55	2,92	<i>GmFAD2-1A e GmFAD2-1B</i>
<b>PL126*</b>	Alto oleico	7,58	3,31	70,64	12,95	5,51	<i>GmFAD2-1A e GmFAD2-1B</i>

\*Plantas obtidas do cruzamento entre PI 603452 e PI 283327.

**Tabela 2: Primers sintetizados para seleção dos controles endógenos**

Glyma	Gene	Primers		Tm (°C)	Referência
		Forward	Reverse		
Glyma.18G216000	UBC4	GAGCGAGCAGTTTCAGAC	CATAGGAGGGACGATACG	55	Miranda et al. 2013
Glyma.19G052400	ELF1A	GACCTTCTTCGTTTCTCGCA	CGAACCTCTCAATCACACGC	55	Miranda et al. 2013
Glyma.02G276600	ELF1B	GTTGAAAAGCCAGGGGACA	TCTTACCCCTTGAGCGTGG	55	Miranda et al. 2013
Glyma.13G318800	60s	AAAGTGGACCAAGGCATATCGTCG	TCAGGACATTCTCCGCAAGATTCC	60	Le et al. 2012
Glyma.12G020500	ABC	GATCAGCAATTATGCACAACG	CCGCCACCATTTCAGATTATGT	60	Le et al. 2012
Glyma.12G051100	Fbox	AGATAGGGAAATTGTGCAGGT	CTAATGGCAATTGCAGCTCTC	60	Le et al. 2012
Glyma.06G038500	UKN2	GCCTCTGGATACCTGCTCAAG	ACCTCCTCCTCAAACCTCCTCTG	60	Hu et al. 2009
Glyma.18G290800	ACT11	ATCTTGACTGAGCGTGGTTATTCC	GCTGGTCCTGGCTGTCTCC	60	Hu et al. 2009
Glyma.05G157300	TUA5	TGCCACCATCAAGACTAAGAGG	ACCACCAGGAACAACAGAAGG	60	Li et al. 2012
Glyma.05G211100	40S	TTCCACCTCGCAACCATGAT	CGAAGCAAACCTCCCTCTTGG	60	Li et al. 2012
Glyma08g28550	APC3	CTGGGCAAAAAGAACTGAAT	AACTGAACTGACTAACAATTCGG	60	Li et al. 2012
Glyma.18G036900	APC2	ATCATGAGTGAACAAAAAGGTTC	AGTCTGAAACAAACTCTCGCC	60	Li et al. 2012
Glyma.12G024700	CYP	ACGACGAAGACGGAGTGG	CGACGACGACAGGCTTGG	60	Li et al. 2012
Glyma.03G137100	Cons7	ATGAATGACGGTTCCTCATGTA	GGCATTAAAGGCAGCTCACTCT	60	Libault et al. 2008
Glyma.20G141600	UBI3	GTGTAATGTTGGATGTGTTCCC	ACACAATTGAGTTCAACACAAACCG	60	Van de Mortel et al. 2007



As sequências dos transcritos *GmFAD2-1A*, *GmFAD2-1B*, *GmFAD3A*, *GmFAD3B* e *GmFAD3C* foram obtidas a partir do banco de dados PHYTOZOME (<http://www.phytozome.net/soybean>). Os primers foram desenhados utilizando o software Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e confirmados de acordo com as sequências depositadas no banco de dados Phytozome. As sequências estão descritas na Tabela 3.

**Tabela 3: Primers desenhados nos genes de interesse para quantificação da expressão em sementes com teor de óleo e proteína contrastantes.**

Glyma	Gene	Primers	Tm (°C)
Glyma.10G278000	<i>GmFAD2-1A</i>	Fw: ACTCATGTGGCTCACCATCTCTT Rv: TTGGTTGCCTCCATTGCAT	59
Glyma.20G111000	<i>GmFAD2-1B</i>	Fw: CATGTGGCTCACCATCTTTTCTC Rv: TGGTTGCCTCCGTTGCA	59
Glyma.14G194300	<i>GmFAD3A</i>	Fw: TCTCACAACACTGTGGATCGTGACT Rv: TGGGTGCCAATGTCATGGT	58
Glyma.02G227200	<i>GmFAD3B</i>	Fw: AAGAAGCCCCGAAAGGA Rv: CACTGGGTGGAAACAGATTGC	58
Glyma.18G062000	<i>GmFAD3C</i>	Fw: AAAGCAGCAAAGGCAGTGCTA Rv: TGGCAATGGCCCAGATTT	59

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em equipamento 7500 Real Time PCR Systems (AppliedBiosystems), utilizando 1 µL do cDNA sintetizado diluído 1:10, 4 µL do *primer Forward* misturado com o *primer Reverse* na concentração de 1,5 µM (cada primer) e 6 µL de SYBR Green PCR Master Mix, sendo três réplicas biológicas de cada genótipo e duas réplicas de mão para cada réplica biológica. O ciclo para as reações de PCR em tempo real foi: 95°C por 10 min e 40 ciclos de: desnaturação 95°C por 15 seg, seguido de anelamento e extensão a 60°C por 1 min. A especificidade dos produtos amplificados foi analisada pelas curvas de dissociação geradas pelo equipamento. Foram utilizados controles negativos sem a adição de cDNA sintetizado e/ou primers para confirmar a ausência de qualquer tipo de contaminante no meio reacional (No Template Control, NTC).

A estatística foi conduzida utilizando os softwares GeNorm (Vandesompele et al. 2002), Delta CT (Silver et al. 2006), BestKeeper (Pfaffl et al. 2004) e NormFinder (Andersen et al. 2004). Para avaliação do perfil de expressão das dessaturases, foram utilizadas as análises recomendadas em Hellemans e colaboradores (2007).

### 3.4) Análise da atividade enzimática

#### 3.4.1) Síntese das sequências e clonagem dos vetores

Para análise da atividade enzimática foram sintetizados cDNA (item 3.2) das linhagens CS303TNKCA mutante e PL04 selvagem (Tabela 1) para o gene *GmFAD3A* que codifica a enzima  $\omega$ -3-dessaturase. Foram desenhados *primers* para amplificação dos fragmentos nas sequências codificadora dos genes, com sítios de restrição para as enzimas BamHI (FAD3A/Fw) e XhoI (FAD3A/Rv e FAD3A-CS303/Rv), utilizadas nos processos de clonagem. As sequências dos *primers* estão descritas na Tabela 4.

**Tabela 4: Primers desenhados para amplificação das sequências à serem clonadas**

Gene	Primers	Amplicon
<i>GmFAD3A</i>	Fw: CCCG↓GATCCATGGTTAAAGACACAAAGCCTT Rw: GGGGCT↑CGAGTCAGTCTCGGTGCGAGTGA	1131
<i>GmFAD3A-CS303</i>	Fw: CCCG↓GATCCATGGTTAAAGACACAAAGCCTT Rv: GGGGCT↑CGAGCTATCCCTTTCTCTCACTGG	624

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 30  $\mu$ L, contendo 2,0  $\mu$ L de cDNA, 3,0  $\mu$ L de 10X PCR Rxn Buffer (Invitrogen), 1,5 mM de MgSO<sub>4</sub>, 200  $\mu$ M de cada deoxinucleotídeo, 0,33  $\mu$ M de cada primer, e 0,5 U de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), com as seguintes condições: 94 °C/2 minutos, e 40 ciclos com: 94°C/15 segundos, 55°C/30 segundos, e 68°C/2 minutos, e para possibilitar maior taxa de amplificação, finalizamos com 68°C/10 minutos. As amplificações obtidas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,2%, e posteriormente purificados utilizando o PureLink Quick Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific).

Os fragmentos obtidos foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI e XhoI (New England Biolabs), em reação contendo 100 ng do produto purificado, 10 U de cada enzima, 2,0  $\mu$ L de NEBuffer 3.1 (New England Biolabs), em volume final de 20  $\mu$ L. A reação foi realizada a 37°C por 2 horas, e em seguida a 85 °C por 10 minutos para inativação da enzima. Os fragmentos digeridos foram clonados no vetor pYES2 Yeast Expression Vector (Thermo Fisher Scientific), previamente digerido com as mesmas enzimas. A reação de clonagem foi realizada em volume final de 20  $\mu$ L, contendo 1,0  $\mu$ L da enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs), 90 fmol do fragmento digerido, 30 fmol do vetor e 2,0  $\mu$ L do T4 DNA Ligase Reaction Buffer (New England Biolabs).

### 3.4.2) Transformação de *Escherichia coli*

Para multiplicação das sequências e validação dos vetores, bactérias da cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* foram transformados com os plasmídeos obtidos. Para a transformação foi utilizado protocolo de choque-térmico. Foram utilizados 1,0  $\mu$ L de vetores clonados (1,5 fmol/ $\mu$ L) e 500  $\mu$ L de suspensão de células competentes. O tubo foi colocado em gelo por 30 minutos e em seguida foi dado choque térmico colocando-o em banho maria a 42°C por exatamente 1 minuto. Imediatamente após o tubo foi recolocado no gelo por 2 minutos e em seguida, adicionado 1 mL de meio LB em temperatura ambiente, para em seguida ser colocado em banho maria a 37°C por 1 hora. Em seguida o tubo foi centrifugado por 90 segundos a 14000 rpm para multiplicação das bactérias. Aproximadamente 1,4 mL de sobrenadante foi removido para que a solução de células seja concentrada em 100  $\mu$ L. As células foram plaqueadas em meio LB com ampicilina para crescimento apenas das colônias transformadas. As placas foram incubadas por 12 a 16 horas a 37°C, e em seguida armazenadas em geladeira.

### 3.4.3) Extração de DNA plasmidial

Após crescimento em meio sólido, colônias isoladas de *E. coli* transformadas foram inoculadas em 2,0 mL de meio LB líquido com ampicilina, antibiótico seletivo para os clones, e incubadas over night a 37 °C a 180 rpm. A extração do DNA plasmidial foi realizada com protocolo de extração Miniprep. Para iniciar o processo de extração do DNA os tubos foram centrifugados em microcentrífugas por 2 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante descartado. Os pellets das colônias foram ressuspensos em 200  $\mu$ L de Solução I (Glicose 9 g/L; Tris HCL 0,025 mol/L; EDTA 0,01 mol/L) e incubados por 10 min em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L de Solução II (NaOH 2 mols/L e SDS 20%) com leve agitação dos tubos e incubados por 5 min no gelo. Após incubação, foram adicionados 200  $\mu$ L de Solução III gelada (KOAc 3 mols/L e HOAc 11,5%) com leve agitação e novamente incubadas por 5 min no gelo. Os tubos foram centrifugados por 10 min a 14000 rpm, 400  $\mu$ L de sobrenadante foram transferidos para microtubo limpo, adicionados 400  $\mu$ L de isopropanol e incubados por 2 horas no gelo. Posteriormente os tubos foram centrifugados por 10 min a 14000 rpm, o sobrenadante descartado e foram adicionados 500  $\mu$ L de etanol 70%, e centrifugados novamente por 10 min a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os tubos deixados a temperatura ambiente aberto para secar o pellet. Após os pellets foram ressuspensos em 30  $\mu$ L de TE com RNase 50  $\mu$ L/mL e armazenados em freezer -20 °C. Para confirmação do

inserto, uma alíquota do DNA plasmidial extraído foi digerido com as enzimas de restrição BamHI e XhoI e submetidos a eletroforese.

#### **3.4.4) Transformação de *Saccharomyces cerevisiae***

Após validação das sequências, os vetores multiplicados pela *E. coli* foram utilizados para transformar células de leveduras da cepa W303 de *S. cerevisiae*, conforme metodologia adaptada de Gietz & Schiestl (2007). Células da levedura foram crescidas em 7 mL de meio YPD a 28°C por 180 rpm até atingirem OD entre 0,5 e 1,5. Após incubação, as colônias foram centrifugadas a 5.000 rpm por 4 min, o sobrenadante descartado, e as células foram ressuspendidas em água estéril e novamente centrifugadas. Em seguida, fez-se o descarte do sobrenadante, as células foram suspensas em 125 µL acetato de lítio 100mM (AcLi) estéril, e transferidas para microtubos de 2,0 mL. Após nova centrifugação a 10.000 rpm/30 segundos, o sobrenadante foi descartado, e as células foram suspensas em 50 µL de AcLi 100mM. Realizou-se uma nova centrifugação a 10.000 rpm/30 segundos e descarte do sobrenadante. Em seguida foram adicionados: 240 µL de PEG5000 50% (polietilenoglicol), 36 µL de AcLi 1M, 25 µL de DNA de esperma de salmão 2 µg/µL e 50 µL de solução do vetor dissolvido em água (entre 2-5 µg), na ordem descrita. As amostras foram suspensas delicadamente, e incubadas a 30°C por 30 minutos, e em seguida a 42°C por 20-25 minutos. Após centrifugação a 8.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado, e adicionado 1mL de água estéril. Seguindo a uma nova centrifugação e descarte do sobrenadante, o pellet foi suspenso em 200 µL de água estéril, plaqueado em meio SD-ura (meio contendo YNB, glicose, e todos os aminoácidos essenciais, exceto uracila), e incubado em estufa por cerca de três dias a 28°C a 180 rpm.

Para estimular a expressão do gene clonado, as leveduras transformadas foram crescidas em 7mL de meio SD contendo galactose ao invés de glicose, a 28°C por 12-16 horas e a 26°C por cerca de 48 horas. Em seguida procedeu-se a extração de ácidos graxos para análise da atividade enzimática.

#### **3.4.5) Extração de ácidos graxos**

Para a extração de ácidos graxos foram utilizados 3 tubos com 7mL de colônias de *Saccharomyces cerevisiae* crescidas em meio SD líquido contendo galactose ao invés de glicose. As colônias de leveduras foram transferidas para tubos de vidro com tampa rosqueável, estes foram centrifugados para retirar o meio SD e proceder a extração. Após centrifugação,

foram adicionadas com 1mL de hexano. Em seguida, as amostras foram borbulhadas com nitrogênio, agitadas em vórtex e acondicionadas a 4°C por 16 horas. Em seguida, a solução de hexano foi transferida para um novo tubo, evaporada com nitrogênio líquido, adicionada com 0,4mL de metóxido de sódio, agitada em vórtex e levada para banho-maria a 30°C por 1 hora. Logo depois, foram adicionados a cada tubo 1mL de água milliQ e 1mL de hexano, agitados em vórtex e acondicionados à temperatura ambiente por 1 hora. Por fim, o sobrenadante, contendo os ácidos graxos foi coletada para novo tubo, adicionada com sulfato de sódio anidro, e transferida para tubos de injeção. A composição de ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa em um aparelho Shimadzu GC-2010 Plus, conforme descrito por Burkey et al. (2007). O conteúdo de ácidos graxos nas amostras foi determinado como uma proporção do total de ácidos graxos, representado em % de óleo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1) Análise da integridade do RNA

O RNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,7%, utilizando 1,4 $\mu$ g de cada amostra, 1,5 $\mu$ L de tampão de corrida com volume final de 6,0 $\mu$ L, para atestar a integridade de bandas. Para efetuar as análises utiliza-se o RNA mensageiro, onde contém as informações para a tradução das proteínas, entretanto, são formados por fitas menores e de tamanhos distintos, que por estes motivos, não são capazes de formar bandas aparentes em eletroforese. Desta forma, a integridade do RNA é avaliada pelas bandas de moléculas maiores, como o RNA 28S, 18S e 5S, que constituem os ribossomos, e o arraste formado no intervalo entre elas é classificado como RNA mensageiro. Na Figura 1 estão apresentados parte dos RNAs extraídos para o trabalho e apresentam excelente padrão de bandas, assim como encontrado na literatura.

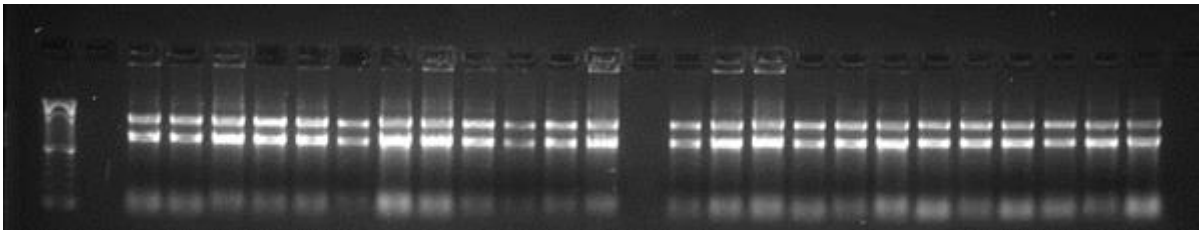


Figura 1: Amostras de RNA extraídas e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,7% para atestar integridade.

### 4.2) Análise da expressão gênica

#### 4.2.1) Avaliação da variação de expressão nos controles endógenos selecionados

Foram realizados experimentos de PCR em tempo real com a finalidade de avaliar a variação da expressão dos 15 genes (Tabela 2) em todos os 13 indivíduos (Tabela 1) selecionados para o experimento. A Figura 2 mostra a variação na expressão dos genes em valores absolutos de Ct. Aparentemente, UBI3 e ABC tiveram a menor variação de Ct entre as amostras avaliadas, no entanto as análises não foram completas para ABC e, portanto, os dados para este gene foram descartados.

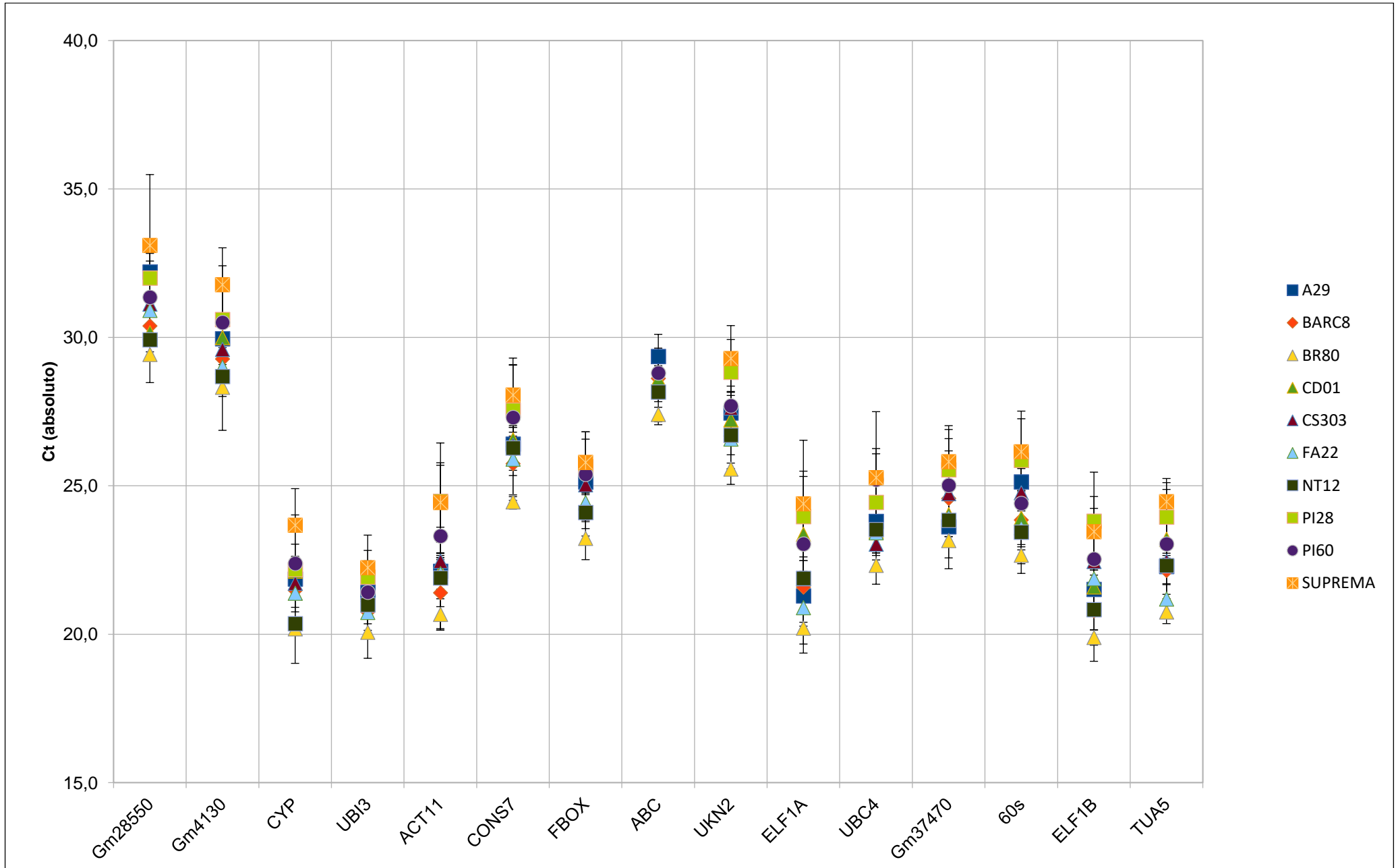


Figura 2: Perfil transcricional dos genes candidatos à controles endógenos em valores absolutos de Ct em todas amostras de sementes avaliadas.

#### 4.2.2) Determinação do número ótimo de genes

Os dados de Ct obtidos na PCR em tempo real foram analisados no software geNorm, visto que a análise de variação é mais complexa do que a simples comparação de Ct. O geNorm, via cálculos estatísticos, determina um número mínimo de genes necessário para a normalização acurada dos dados, uma vez que seus autores sugerem a utilização de dois ou mais genes para normalização ao invés de apenas um como foi muito difundido na literatura nos primórdios dos estudos de expressão gênica utilizando PCR em tempo real. De acordo com os autores, genes em que a combinação tenha valores abaixo de 0,150 são eficientes para as análises. Desta forma, o software determinou que de 2 a 3 três genes era o número mínimo de genes suficientes para o desenvolvimento do trabalho e normalização dos dados (Figura 3)

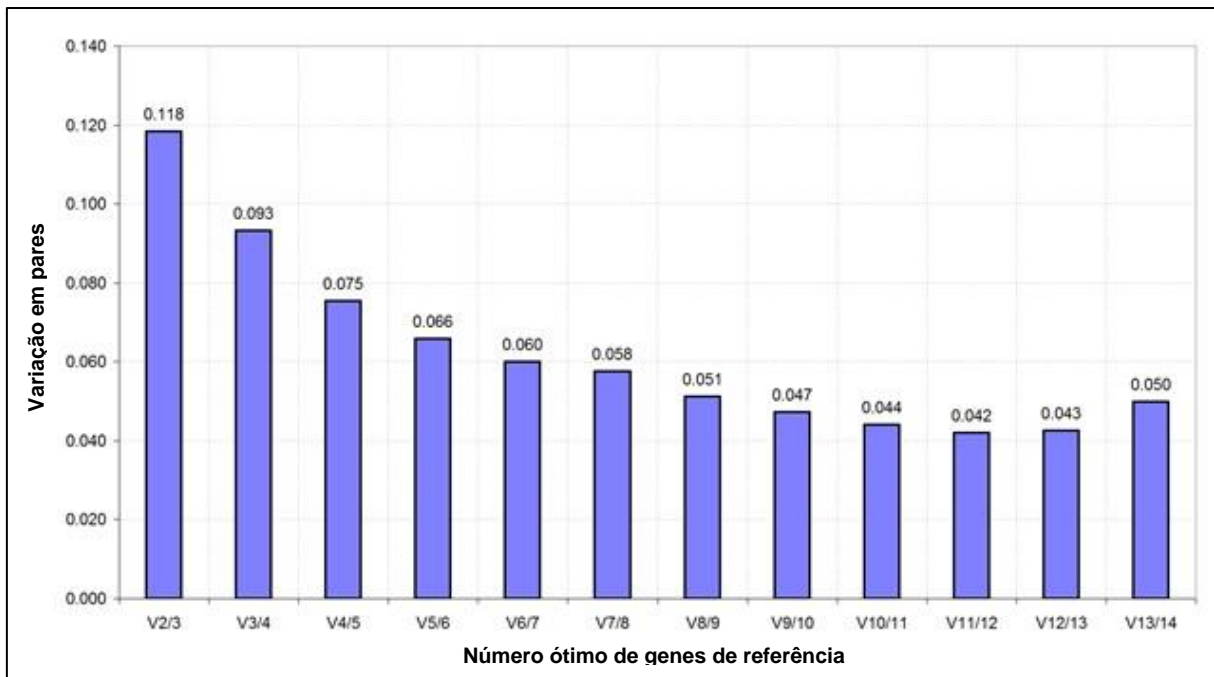


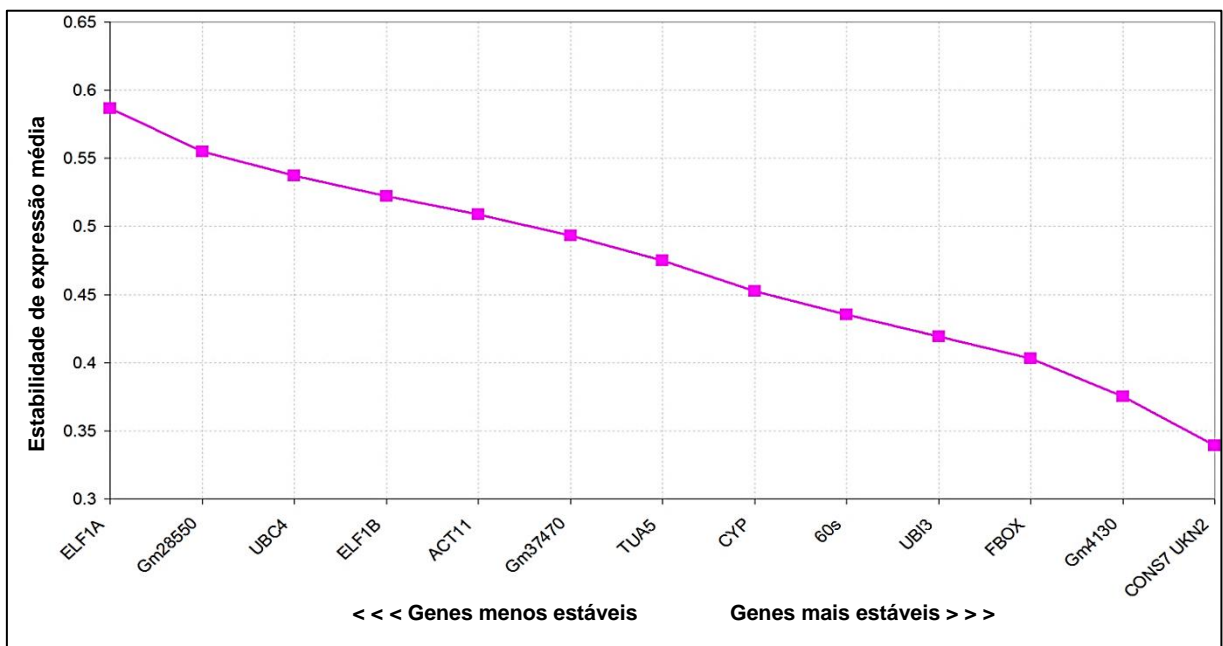
Figura 3: Determinação do número ideal de genes controle para normalização

#### 4.2.3) Seleção dos genes mais estáveis

Para análise de expressão gênica é necessário utilizar como controle endógeno o gene que tenha a expressão mais estável no organismo a ser estudado independente das condições edafoclimáticas as quais ele é submetido. Os genes utilizados no presente trabalho, mostrados na Tabela 2, foram descritos como controles endógenos para soja, embora tenham apresentado



alguma variação de expressão nos genótipos utilizados no trabalho (Figura 2). Na etapa de seleção, o geNorm classifica os genes com base na estabilidade dos valores de expressão  $M$ , onde  $M$  é a média do pareamento da variação de um gene particular contra todos os outros genes testados. Valores de  $M$  inferiores a 0,5 são ideais, entretanto, quanto menor for este valor mais estável é o gene. Com base nos valores obtidos, o geNorm selecionou CONS7 e UKN2 como controles endógenos mais estáveis do experimento. A Figura 4 mostra o ranqueamento dos 15 genes com base na estabilidade de expressão calculada pelo geNorm.



**Figura 4: Valores de estabilidade de expressão dos genes de controle**

Em busca de outras formas de analisar os dados e obter resultados mais confiáveis, foi utilizado o software online refFinder que reúne quatro softwares para a análise dos dados, que são, além do geNorm, os softwares Delta CT, BestKeeper e NormFinder. Entretanto, o RefFinder possui a limitação de proceder a análise de apenas dez normalizadores. A Figura 5 reúne a informação de todos os softwares e confirma a determinação dos controles endógenos pelo geNorm: CONS7 e UKN2, indicando que a combinação de várias metodologias de análise, valida estes 2 genes como os melhores controles endógenos para o nosso experimento.

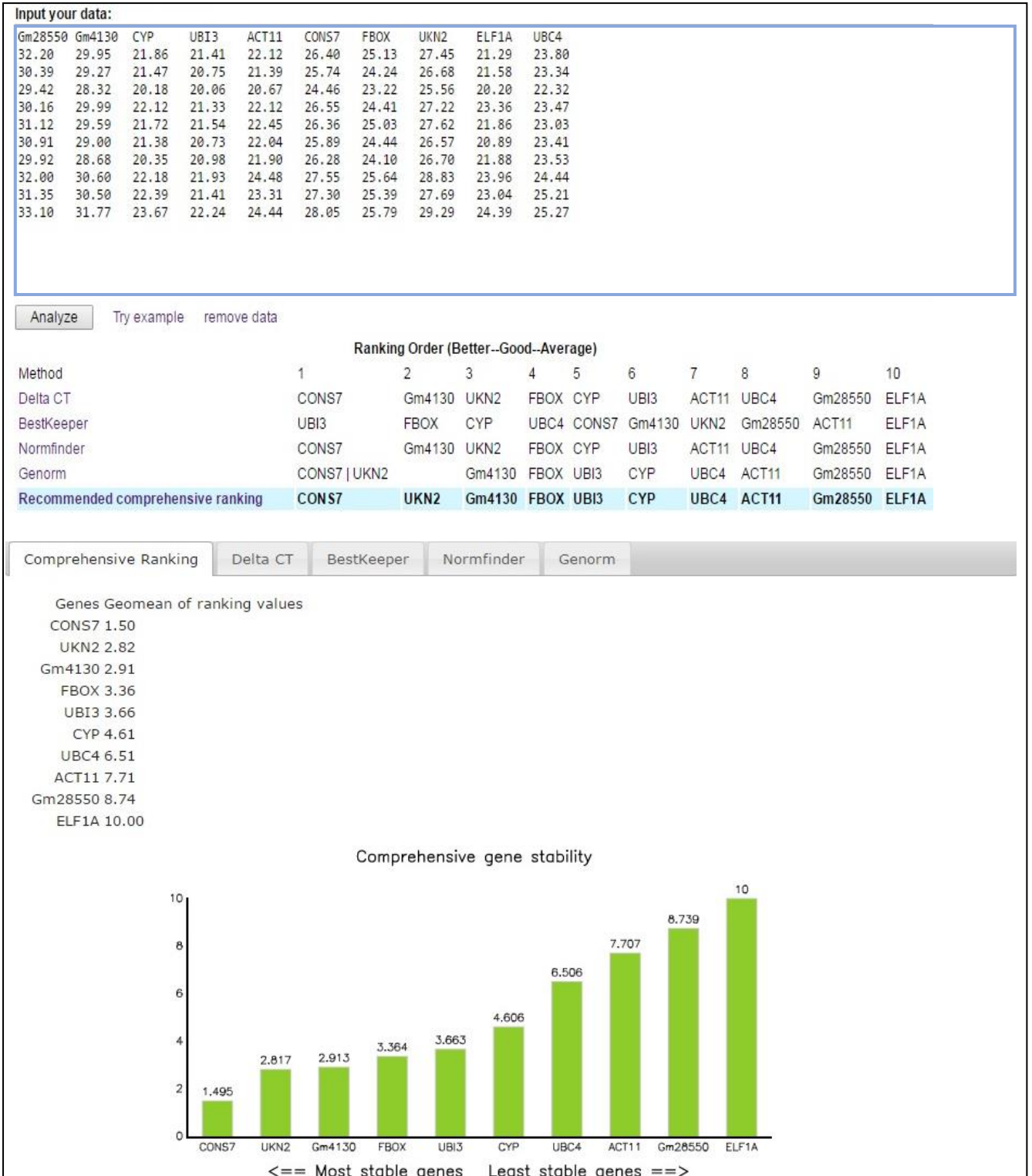


Figura 5: Ranking de estabilidade dos genes obtido pelo RefFinder

#### 4.2.4) Análise da expressão gênica das dessaturase

Os experimentos de expressão gênica foram realizados com todos os indivíduos da Tabela 1, utilizando os primers para os genes a serem analisados (Tabela 3) e os genes selecionados como controles endógenos, UKN2 e CONS7. Para proceder as análises foram feitos cálculos para normalização da expressão dos genes *GmFAD2* e *GmFAD3* em relação aos genes utilizados como controles e em seguida os dados foram plotados para análise gráfica (Figuras 5 e 6). Todos os cálculos foram conduzidos segundo Hellemans e colaboradores (2007).

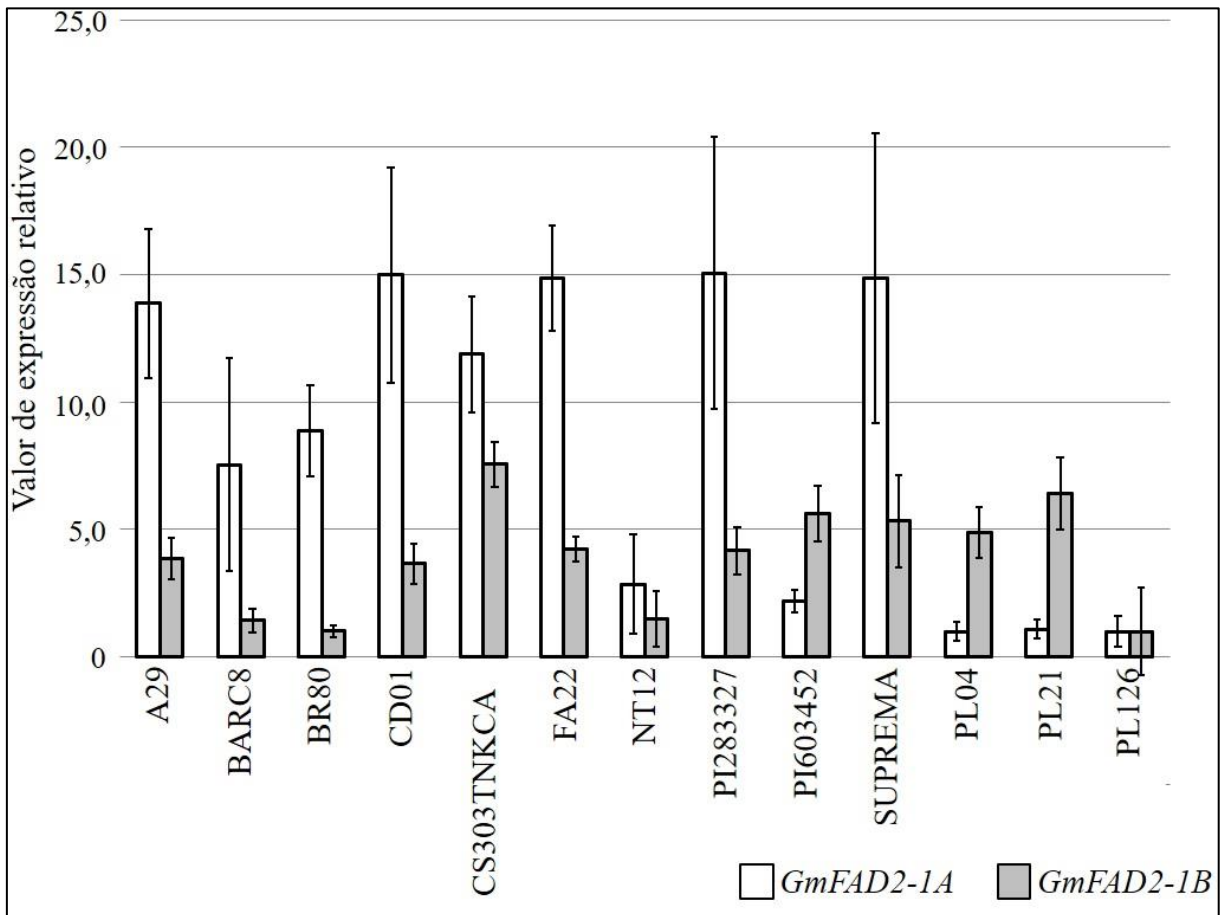
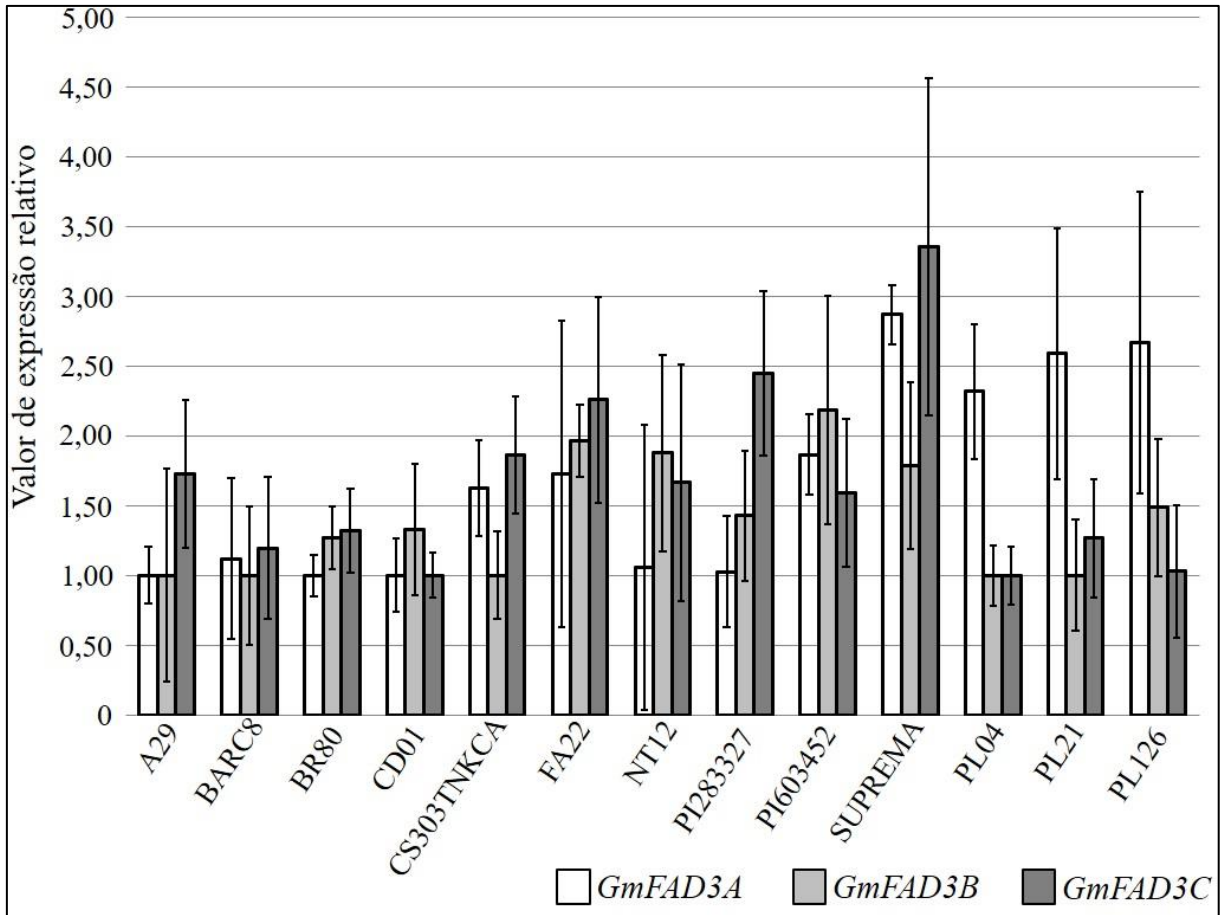


Figura 5: Padrão de expressão gênica de sementes em desenvolvimento para as isoformas do gene *GmFAD2* em relação aos genes selecionados para controles endógenos, UKN2 e CONS7.



**Figura 6: Padrão de expressão gênica de sementes em desenvolvimento para as isoformas do gene *GmFAD3* em relação aos genes selecionados para controles endógenos, UKN2 e CONST7.**

A partir dos dados obtidos, é possível inferir que *GmFAD2-1A* é o mais expresso em todos os materiais utilizados com teores normais de ácido oleico e em relação a todos os outros genes. Em contrapartida, constata-se no gráfico que a linhagem PI603452, mutante para o *GmFAD2-1A*, assim como as plantas derivadas do cruzamento da mesma com a linhagem PI283327 (Tabela 1), têm a expressão deste gene reduzida. Observamos também que a variedade NT12 possui taxa de expressão do gene *GmFAD2-1A* inferior às demais. Contrariamente, a mutação no *GmFAD2-1B*, presente na PI283327, que codifica para uma enzima de mesma função, não desencadeia alterações na expressão do gene, visto que todos os materiais possuem expressão similar para este gene, não sendo possível reconhecer um padrão. Há de se ressaltar apenas uma expressão menor nas variedades NT12, BARC8 e BR80, que contém alto teor de proteína e baixo teor de óleo.

Em relação ao *GmFAD3* e suas isoformas, não foram detectadas neste trabalho nenhuma possível alteração causada pelas mutações encontradas nas linhagens CS303TNKCA (mutação em *GmFAD3A*) e A29 (mutação em *GmFAD3A*, *GmFAD3B* e *GmFAD3C*), visto que ambas possuem baixo teor de ácido linolênico em comparação as linhagens convencionais. Todavia, é possível observar que a expressão do gene *GmFAD3A* é maior nas plantas que possuem alto teor de ácido oleico, derivadas do cruzamento entre PI603452 e PI283327, em relação a expressão dos genes *GmFAD3B* e *GmFAD3C*.

### 4.3) Análise de atividade enzimática

A variedade CS303TNKCA desenvolvida pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO é derivada da variedade Monarca (COOPADAP) e da linhagem BARC-12 (Leffel 1994). Dentre suas características, a CS303TNKCA não codifica para lipoxigenases funcionais (*lox1*, *lox2* e *lox3*) e o inibidor de Kunitz, possui teor de óleo entre 20-23%, apresenta baixo teor de ácido linolênico (3,4 - 4,4%) e deleção de uma adenina (delA) na sequência CDS do gene *GmFAD3A*, codificante da enzima  $\omega$ -3-dessaturase, responsável pela conversão do ácido linoleico em ácido linolênico. Em trabalhos anteriores, foi verificado que esta mutação acarreta o aparecimento de um códon de parada prematuro, gerando uma enzima  $\omega$ -3-dessaturase com apenas 207 resíduos de aminoácidos, 169 a menos que linhagens selvagens (Silva, 2017). Este fragmento compreende uma das três regiões ricas em histidina da proteína (H-box3) essencial para a atividade catalítica das dessaturases (Shanklin et al. 1994). Em busca de analisar os efeitos desta mutação e sua relação com o teor de ácido linolênico nos grãos da CS303TNKCA, avaliamos com base na produção de ácidos graxos poli-insaturados, a atividade desta enzima por meio da expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* da cepa W303. Além da clonagem do gene mutante da variedade CS303TNKCA, realizamos também a transformação com vetor clonado com o gene *GmFAD3A* selvagem e com vetor não clonado. O perfil de ácidos graxos das colônias encontra-se na Tabela 5.

**Tabela 5: Perfil de ácidos graxos de levedura selvagem, transformada com gene mutante e selvagem.**

Colônia	Doador de Alelo	Palm	Pole	Este	Ole	Lino	Lile
Selvagem	-	14,66	36,27	7,73	39,04	2,3	ND
<i>GmFAD3A</i>	PL04	16,92	22,30	13,71	34,04	8,48	4,55
<i>GmFAD3A delA</i>	CS303TNKCA	15,53	36,35	10,57	35,14	2,42	ND

**Palm** = Ácido Palmítico; **Pole** = Ácido Palmitoleico; **Este** = Ácido Esteárico; **Ole** = Ácido Oleico; **Lino** = Ácido Linoleico; **Lile** = Ácido Linolênico. Valores calculados a partir da média de três análises, cada uma contendo três colônias. **ND** = não detectável.

Colônias transformadas com alelo selvagem, derivado da planta PL04, foram capazes de produzir 8,48% de ácido linoleico e 4,55% de ácido linolênico. Em contrapartida, leveduras transformadas com *GmFAD3A delA* produziram 2,42% de ácido linoleico, e não produziram ácido linolênico em nível detectável. Os teores de ácidos graxos poli-insaturados encontrados nas colônias transformadas com vetor não clonado, em que simulamos leveduras selvagens, foram similares aos de colônias transformadas com *GmFAD3A delA*.

## 5. DISCUSSÃO

Ao analisar os dados de expressão gênica, uma das primeiras perguntas a serem respondidas é a respeito da qualidade do controle endógeno utilizado no experimento. No presente trabalho, foram conduzidos experimentos que permitiram a identificação, em uma lista de controles endógenos de soja, o mais adequado ao nosso experimento. A seleção dos controles endógenos CONS7 e UKN2 foi realizada utilizando os softwares geNorm e refFinder. A partir deste resultado, conduzimos análises de expressão gênica das dessaturases em sementes de soja no estágio de desenvolvimento R6. Nas análises realizadas via dados de qRT-PCR, o *GmFAD2-1A* apresentou maior taxa expressão, exceto nas linhagens NT12, PI603452, PL04, PL21 e PL126. Tang et. al. (2005) utilizando a expressão heteróloga na levedura *Saccharomyces cerevisiae* constatou que a isoforma *GmFAD2-1A* é mais instável que o *GmFAD2-1B* (que se diferem por apenas por 24 resíduos de aminoácido), nos levando a inferir que a maior expressão do *GmFAD2-1A* seja parte de uma estratégia compensatória da sua instabilidade. Além disso, Pham et al. (2011) caracterizou na linhagem PI603452 uma mutação no gene *GmFAD2-1A* que altera a atividade da enzima e pode ser capaz de reduzir sua expressão, dados confirmados em nossas análises, visto que esta linhagem e as plantas derivadas de seu cruzamento com a PI283327 (PL04, PL26 e PL126), demonstraram níveis de expressão inferiores aos de plantas selvagem para este gene. A variedade NT12, que possui alto teor de proteína e baixo teor de óleo, apresentou taxa de expressão do gene *GmFAD2-1A* inferior aos demais genótipos selvagens para estes genes, e ainda menor que as variedades que detém suas mesmas características fenotípicas (BARC8 e BR80). Além disto, foi observado uma menor taxa de expressão do gene *GmFAD2-1B* nas variedades NT12, BARC8 e BR80, fato este que pode estar associado com a diferença de conteúdo de óleo entre as variedades. Possivelmente, plantas com um maior acúmulo de óleo necessitam de uma maior atividade dos genes *GmFAD2*. Estas particularidades não foram possíveis de serem associadas diretamente neste trabalho, mas será investigada em trabalhos posteriores.

Em relação às isoformas do gene *GmFAD3*, não houve diferenças de expressão entre linhagens que apresentam baixo teor de ácido linolênico (CS303TNKCA e A29) e linhagens com teores normais para esta característica. Apesar disso, observamos que o gene *GmFAD3A* obteve maior expressão em plantas com maior teor de ácido oleico derivadas do cruzamento entre PI603452 e PI283327 quando comparado aos genes *GmFAD3B* e *GmFAD3C*, entretanto,

não foi possível identificar a causa deste evento. Para a variedade CS303TNKCA foi caracterizada mutação no gene *GmFAD3A* (Silva, 2017), que apesar de ser semelhante à caracterizada por Pham et al. (2011) na linhagem PI603452 (deleção de uma adenina que acarreta a síntese da enzima  $\omega$ -6-dessaturase com 191 resíduos de aminoácidos a menos que linhagens selvagens), a deleção de uma adenina (delA) no primeiro caso, não parece acarretar alterações na expressão do gene, diferentemente da PI603452 e plantas derivadas, que apresentam reduzida taxa de expressão do gene mutante, *GmFAD2-1A*.

Afim de investigar mais sobre o baixo teor de ácido linolênico nos grãos da CS303TNKCA e associá-lo com a mutação delA no gene *GmFAD3A*, promovemos a análise da atividade enzimática através da expressão heteróloga, do gene mutante e selvagem, em *Saccharomyces cerevisiae* da cepa W303. Após análise fenotípica obtivemos que colônias de leveduras transformadas com alelo selvagem, obtidos da planta PL04, foram capazes de produzir 8,48% de ácido linoleico e 4,55% de ácido linolênico. Em contrapartida, leveduras transformadas com *GmFAD3A* delA produziram somente 2,42% de ácido linoleico, e não produziram ácido linolênico, em nível detectável pelo aparelho, resultado semelhante às colônias transformadas com vetor não clonado, simulando leveduras selvagens. Em estudo equivalente, Singer et al. (2014) expressou o gene *BoFAD3-2* de *Brassica oleracea* em *Saccharomyces cerevisiae* e concluiu que houve redução drástica na atividade da enzima  $\Delta$ -15-dessaturase codificada pelo gene mutante em relação ao selvagem, que acarreta redução da síntese de ácido linolênico. De forma análoga, Reinprecht et al. (2009) caracterizaram na linhagem RG10 a troca de uma Guanina por uma adenina na região codificante do *GmFAD3A*. Esta mutação acarreta um códon de parada prematuro, gerando uma enzima com 111 resíduos de aminoácidos a menos, incluindo o H-box3, e foi associada a redução de ácido linolênico à cerca de 3,4% nesta variedade.

Mediante os resultados obtidos e associação a outros trabalhos, foi possível inferir que a mutação delA do gene *GmFAD3A* da variedade CS303TNKCA, acarreta a tradução de uma enzima  $\omega$ -3-dessaturase não funcional e que esta mutação está diretamente ligada ao reduzido teor de ácido linolênico desta variedade. Em contrapartida, é importante ressaltar que apesar deste gene não gerar uma proteína funcional, a planta ainda possui duas isoformas do gene *GmFAD3*, o *GmFAD3B* e *GmFAD3C*, que não possuem mutação nesta variedade, e são os responsáveis pela produção de ácido linolênico no grão, ainda que esta seja muito inferior às variedades convencionais.



## 6. CONCLUSÕES

- Identificamos bons controles endógenos para experimentos de PCR em tempo real utilizando variedades contrastantes para o teor de óleo e proteína;
- Observamos que a mutação no gene *GmFAD2-1A* da planta PI603452 acarreta uma redução da expressão deste gene, mas ainda não temos como responder o que acarreta este fenômeno;
- Esta diferença de expressão pode ser utilizada como marca na seleção de indivíduos derivados de cruzamento com a PI603452;
- A mutação presente no gene *GmFAD2-1B* da linhagem PI283327 não acarreta alterações na taxa de expressão do gene;
- A mutação presente na sequência CDS da enzima  $\omega$ -3-dessaturase da variedade CS303TNKCA, acarreta a síntese de uma enzima não funcional e está diretamente associada ao seu baixo teor de ácido oleico.

## 7. PERSPECTIVAS

- Desenvolver variedades com alto teor de ácido oleico e baixo teor de ácido linolênico através da seleção assistida por marcadores moleculares, utilizando como doadores os alelos mutantes presentes nas linhagens PL04 e CS303TNKCA;
- Analisar a taxa de expressão dos genes *GmFAD2-2* e *GmFAD2-3* para verificar a influência destes na característica estudada;
- Analisar a atividade enzimática do *GmFAD2-1A* e *GmFAD2-1B* para associar o teor de ácidos graxos poli-insaturados nas linhagens mutantes;
- Avaliar porque a taxa de expressão do *GmFAD3A* nas linhagens PL04, PL21 e PL126 foram maiores que para o *GmFAD3B* e *GmFAD3C*;
- Verificar porque a taxa de expressão dos genes *GmFAD2-1A* e *GmFAD2-1B* nas cultivares NT12, BARC8 e BR80 foram similares às plantas contendo alto teor de ácido oleico.

## 8. REFERÊNCIAS

- ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2017**. Rio de Janeiro, 30 de agosto de 2017. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/publicacoes/anuario-estatistico/3819-anuario-estatistico-2017>> Acesso em: 25 de Outubro de 2017.
- ABIOVE – Associação Brasileira de Óleos Vegetais. Nova projeção da ABIOVE eleva para 104,60 milhões de t a safra de soja em 2017. **Nota à Imprensa**. São Paulo, 13 de fevereiro de 2017. Disponível em: <[http://www.abiove.org.br/site/FILES/Portugues/13022017-114449-13\\_02\\_2017\\_-\\_nota\\_a\\_imprensa\\_-\\_estatisticas.pdf](http://www.abiove.org.br/site/FILES/Portugues/13022017-114449-13_02_2017_-_nota_a_imprensa_-_estatisticas.pdf)>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2017.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.
- ALONSO, D.L.; MAROTO, F.G. Plant as “chemical factories” for the production of polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**; p.19, p.481-497, 2000.
- BAUD, S.; LEPINIEC, L. Physiological and developmental regulation of seed oil production. **Progress in Lipid Research**, v.49, p.235-249, 2010.
- BRASIL. Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016.
- BURKEY, K. O. et al. Elevated carbon dioxide and ozone effects on peanut: II. Seed yield and quality. **Crop Science**, v. 47, n. 4, p. 1488-1497, 2007.

- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Monitoramento Agrícola. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos, V. 4 - SAFRA 2016/17 - N. 5 -** Quinto levantamento, Fevereiro 2017.
- FORMIGONI, I. O Farmnews atualiza os dados de exportação de soja do Brasil em 2016, **FarmNews**. 11 de Janeiro de 2017. Disponível em: <http://www.farmnews.com.br/analises-mercado/exportacao-de-soja-em-2016/>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2017.
- MIRANDA, V. J. et al. Validation of reference genes aiming accurate normalization of qPCR data in soybean upon nematode parasitism and insect attack. **BMC Research Notes**, v. 6, n. 1, p. 196, 2013.
- HELLEMANS, Jan et al. qBase Relative Quantification Framework and Software for Management and Automated Analysis of Real-Time Quantitative PCR Data. **Genome Biology**, 8.2 (2007): R19. *PMC*. Web. 28 Mar. 2017.
- HU, R. et al. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 10, n. 1, p. 93, 2009.
- LE, D. T. et al. Evaluation of candidate reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in soybean tissues under various abiotic stress conditions. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e46487, 2012.
- LEFFEL, R. C. Registration of BARC-12, a low linolenic acid soybean germplasm line. **Crop Science**, v. 34, n. 5, p. 1426-1427, 1994.
- LI, Q. et al. Validation of reference genes for real-time quantitative PCR normalization in soybean developmental and germinating seeds. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 10, p. 1789-1798, 2012.

- LI, L. et al. Molecular cloning and characterization of a novel microsomal oleate desaturase gene from soybean. **Journal of Plant Physiology**; v.164, p.1516-1526, 2007.
- LIBAULT, M. et al. Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. **The Plant Genome**, v. 1, n. 1, p. 44-54, 2008.
- PHAM, A. T. et al. A novel FAD2-1 A allele in a soybean plant introduction offers an alternate means to produce soybean seed oil with 85% oleic acid content. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 123, n. 5, p. 793-802, 2011.
- PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 509-515, 2004.
- REINPRECHT, Y. et al. Molecular basis of the low linolenic acid trait in soybean EMS mutant line RG10. **Plant Breeding**, v. 128, n. 3, p. 253-258, 2009.
- TANG, G. et al. Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation. **The Plant Journal**, v. 44, n. 3, p. 433-446, 2005.
- SCHLUETER, et al. The FAD2 gene family of soybean: Insights into the structural and functional divergence of a paleopolyploid genome. **Crop Science**; v.47, p.S14-S26, 2007.
- SHANKLIN, J.; WHITTLE, E.; FOX, B. G. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. **Biochemistry**, v. 33, n. 43, p. 12787-12794, 1994.
- SHI, J. et al. A rice microsomal delta-12 fatty acid desaturase can enhance resistance to cold stress in yeast and *Oryza sativa*. **Molecular Breeding**, v. 29, n. 3, p. 743-757, 2012.

- SILVER, N. et al. Selection of Housekeeping Genes for Gene Expression Studies in Human Reticulocytes Using Real-Time PCR. **BMC Molecular Biology** 7 (2006): 33. *PMC*. Web. 29 Oct. 2017.
- SILVA, L.C.C. **Caracterização molecular de alelos associados à qualidade do grão de soja**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa. 131p. Viçosa-MG, 2017.
- SINGER, S. D.; WESELAKE, R. J.; RAHMAN, H. Development and characterization of low  $\alpha$ -linolenic acid *Brassica oleracea* lines bearing a novel mutation in a ‘class a’ FATTY ACID DESATURASE 3 gene. **BMC Genetics**, v. 15, n. 1, p. 94, 2014.
- SUN, R. et al. Identification of a  $\Delta$ 12 fatty acid desaturase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) involved in the biosynthesis of linoleic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 591, n. 1, p. 21-26, 2016.
- TANG, G. et al. Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation. **The Plant Journal**, v. 44, n. 3, p. 433-446, 2005
- VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. research0034.1-12, 2002.
- VAN DE MORTEL, M. et al. Distinct biphasic mRNA changes in response to Asian soybean rust infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 8, p. 887-899, 2007.
- ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 5ª ed. Porto Alegre. Editora: Mercado Aberto, 2003. 424p
- ZHANG, J. et al. Arabidopsis fatty acid desaturase FAD2 is required for salt tolerance during seed germination and early seedling growth. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30355, 2012