

# Identificação de genes normalizadores para estudos de expressão gênica associada à oleorresinose em *Pinus elliotii*

Magnus Riffel Kerber<sup>1</sup>; Arthur Germano Fett Neto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## Introdução

A produção de oleorresina, uma complexa mistura de terpenos (mono, sesqui e diterpenos), que possui duas frações principais (terebintina e breu), representa uma importante atividade econômica que fornece matéria-prima para a indústria farmacêutica, alimentícia, agroquímica e química. Derivados da oleorresina de *Pinus*, extraídos por meio de incisões periódicas na casca, seguida de aplicação de pastas indutoras de exsudação, encontram aplicações em tintas de impressora, tintas automotivas, revestimentos de superfícies, adesivos, desinfetantes, fármacos, aromatizantes e flavorizantes, além de bioinseticidas<sup>1,2</sup>.

Terpeno sintases são enzimas envolvidas em rotas de produção de terpenos componentes da oleorresina, e estudos de expressão de genes codificadores destas enzimas são importantes para caracterização de fatores que afetam a produção de resina. Visto a escassez de estudos conclusivos em relação a genes normalizadores para avaliação da expressão de genes envolvidos na produção de oleorresina, faz-se necessário um estudo para caracterização de genes que possam ser utilizados como tais em reações de qPCR. Esta informação é essencial para melhor elucidar as bases moleculares da síntese da resina, por meio do entendimento da expressão gênica associada a este fenômeno, bem como a futura caracterização dos genes envolvidos.

## Materiais e Métodos

Árvores de *Pinus elliotii*, com idade de 8 anos e DAP de no mínimo 17 cm, localizadas em propriedade da empresa Irani Celulose S.A., em Balneário Pinhal, RS, (latitude: -30.1747, longitude: -50.2076), foram utilizadas no experimento.

Os tratamentos neste experimento constituem em uma condição controle (somente a estria – estímulo mecânico) e outros 3 tratamentos independentes contendo, além do estímulo mecânico, diferentes adjuvantes químicos em suas pastas indutoras (vide **Tabela 1**). Para cada tratamento foram selecionadas 5 árvores que vinham sendo estriadas a cada 15 dias pelo período de um ano. A coleta de material biológico foi feita através de raspagens da madeira na região do câmbio após realização da estria (**dias 0, 5, 8 e 15**) (Ver **Fig. 1**).



5 árvores / tratamento



**Figura 1.** Árvore de *Pinus* estriada visando a oleoresinagem.

**Tabela 1.** Tratamentos e composição das pastas utilizadas no experimento.

TRATAMENTOS	PASTAS UTILIZADAS
Controle	-
Potássio	Ácido Sulfúrico 20 % + Potássio 500mM
Auxina	Ácido Sulfúrico 20 % + Ácido Naftaleno Acético (NAA) – 1 mM
Ethrel	Ácido Sulfúrico 20 % + Ethrel 3 %

As extrações de RNA total foram realizadas com o reagente Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen®). A quantificação de RNA foi feita através da utilização do espectrofotômetro NanoDrop (LifeTechnologies®). Os transcritos foram detectados por qRT-PCR, utilizando-se o reagente SYBR Green (1:10000 Molecular Probes) e o aparelho da Applied Biosystems StepOne.

Os resultados foram analisados pelo método de CT comparativo ( $\Delta CT$ ) conforme descrito<sup>3</sup>. Os genes candidatos à normalizadores foram: *ciclofilina* (*P. taeda*),  *$\alpha$ -tubulina* (*P. taeda*), *proteína éter redutase –REDUC* (*P. pinaster*) e *fator de alongação 1 $\alpha$ -eEF* (*P. pinaster*), baseados no trabalho de Vega-Bartol et al<sup>4</sup>. O gene alvo testado corresponde ao que codifica para terpeno sintase – *Pc2\_TPS* em *P. contorta*.

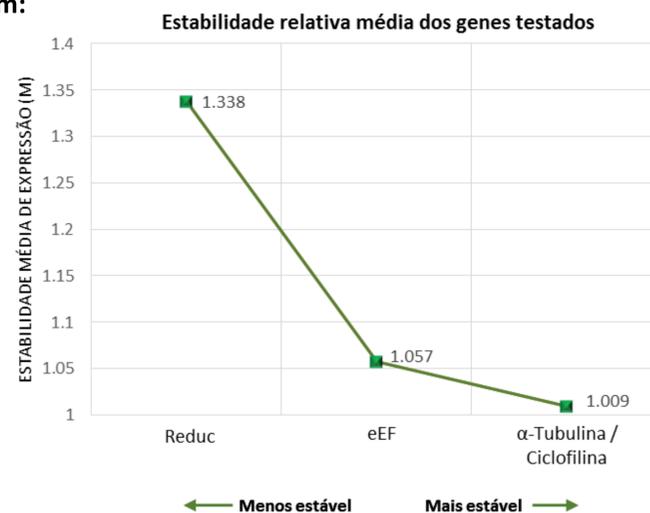
### Referências:

- Stubbs J, Roberts DR, Outcalt KW (1984) Chemical Stimulation of lightwood in southern pines. General Technical Report SE-25. United States Department of Agriculture, Forest Service, Southeastern Forest Experiment Station, Asheville, North Carolina.
- Lee H, Ravn M, Coates RM (2001) Synthesis and characterization of abietadiene, levopimaradiene, palustradiene, and neoabietadiene: hydrocarbon precursors of the abietane diterpene resin acids. *Tetrahedron* 57: 6155-6157.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25: 402-408.
- Vega-Bartol J, Santos RR, Simões M, Miguel C (2013) Normalizing gene expression by quantitative PCR during somatic embryogenesis in two representative conifer species: *Pinus pinaster* and *Picea abies*. *Plant Cell Reports* 32 (5): 715-729.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3: RESEARCH0034.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF (2004) 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* 64: 5245-5250.
- Sharon-Asa L, Shalit M, Frydman A, Bar E, Holland D, Or E, Lavi U, Lewinsohn E and Eyal Y (2003) Citrus fruit flavor and aroma biosynthesis: Isolation, functional characterization, and developmental regulation of *Cstps1*, a key gene in the production of the sesquiterpene aroma compound valencene. *Plant J* 36:664-674.

## Resultados e Discussão

Foram utilizadas ferramentas de bioinformática para aferição dos resultados e indicação dos melhores genes referência para a condição testada. Os programas **geNorm**<sup>5</sup> e **NormFinder**<sup>6</sup> foram os escolhidos para o experimento.

**geNorm:**



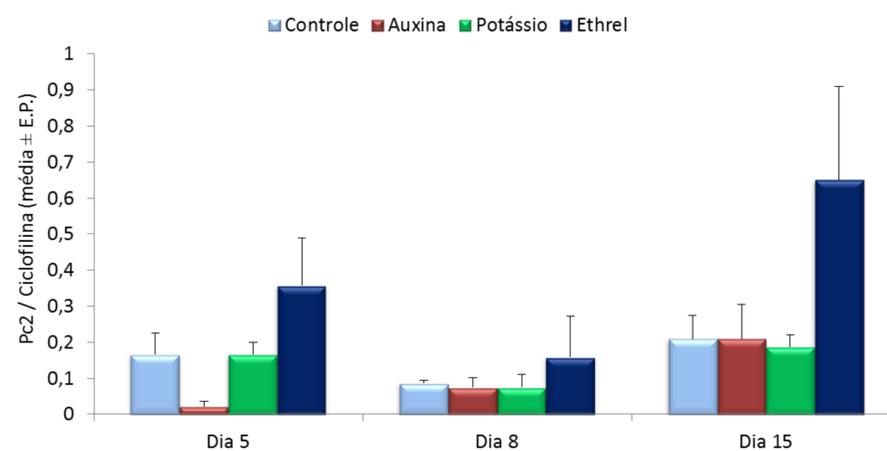
**Figura 2:** Valores de estabilidade atribuídos pelo software GeNorm aos genes candidatos à normalizador. Os genes  $\alpha$ -tubulina e Ciclofilina (**M = 1.009**) foram considerados os genes mais estáveis, seguidos pelo gene eEF (**M = 1.057**). O gene Reduc (**M = 1.338**) figura como o gene menos estável para a análise de expressão.

**NormFinder:**

**Tabela 2.** Valores de estabilidade atribuídos pelo software NormFinder aos genes candidatos à normalizador, em ordem decrescente de estabilidade. A combinação mais estável foi de eEF e ciclofilina, sendo o gene eEF o mais estável dentre todos.

Ordem	Gene	Valor de estabilidade
1	eEF	0.0105
2	Ciclofilina	0.0965
3	$\alpha$ -Tubulina	0.1466
4	Reduc	0.1523

**Análise de expressão de terpeno sintase através de RT-qPCR:**



**Figura 3.** Análise da expressão do gene *Pc2* através de RT-qPCR utilizando o gene *ciclofilina* como normalizador. Durante os dias analisados, as árvores tratadas com a pasta indutora contendo ETHREL apresentaram maior expressão da terpeno sintase avaliada quando comparado ao grupo controle. Os tratamentos AUXINA e POTÁSSIO não apresentaram efeito positivo na produção de transcritos da enzima. Valores são médias de 3 replicatas biológicas  $\pm$  erro padrão.

A partir dos resultados obtidos, com base em ambos softwares aplicados, concluiu-se que o gene *ciclofilina* é o mais indicado como normalizador para análises de expressão gênica em *P. elliotii* nas condições testadas. Resultados de RT-qPCR demonstraram um aumento na produção de transcritos de terpeno sintase em árvores que receberam a pasta indutora contendo Ethrel. Este composto é precursor de etileno, molécula sinalizadora envolvida em reações de estresse e já amplamente utilizado em composição de pastas indutoras pelo seu efeito positivo na produção de resina. Há relatos que etileno é capaz de induzir a expressão de algumas terpeno sintases<sup>7</sup>. Nossas perspectivas futuras são de avaliar a estabilidade de mais genes para as condições de oleorresinose testadas.