



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**WASHINGTON LUIZ GOMES COSTA**

**ANÁLISE ESPACIAL E TEMPORAL DA EXPRESSÃO DE GENES  
RELACIONADOS AO METABOLISMO DE LIPÍDIOS EM  
SEMENTES DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

**FORTALEZA - CE**

**2013**

**WASHINGTON LUIZ GOMES COSTA**

**ANÁLISE ESPACIAL E TEMPORAL DA EXPRESSÃO DE GENES  
RELACIONADOS AO METABOLISMO DE LIPÍDIOS EM  
SEMENTES DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de Concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof<sup>o</sup> Francisco A. P. Campos

**FORTALEZA – CE**

**2013**

Dados Internacionais de Catalogação  
na Publicação  
Universidade  
Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências  
e Tecnologia

C876a Costa, Washington Luiz Gomes.  
Análise espacial e temporal da expressão de genes relacionados ao metabolismo de  
lipídios em  
sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) / Washington Luiz Gomes

---

Costa. – 2013.

87 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,  
Departamento de  
Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza,  
2013.

Área de concentração: Biologia Molecular.

Orientação: Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos.

1. *Jatropha curcas*. 2. Sementes. 3. Lipídeos. 4. Expressão gênica. I. Título.

---

CDD 574.192

**WASHINGTON LUIZ GOMES COSTA**

**ANÁLISE ESPACIAL E TEMPORAL DA EXPRESSÃO DE GENES  
RELACIONADOS AO METABOLISMO DE LIPÍDIOS EM  
SEMENTES DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em \_\_/\_\_/\_\_\_\_ **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Francisco A. P. campos

Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Dr. Fábio César Sousa Nogueira

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

---

Prof. José Hélio Costa

Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Dr. Fabiano Moura Teixeira

Universidade Federal do Ceará - UFC

Com amor, dedico à minha mãe **Margarida Gomes**,  
minha esposa **Regina** e aos meus filhos **Clara e Ian**.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** por todas as conquistas alcançadas.

À **minha família**, pela compreensão, por acreditarem em mim desde o início, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas, pelos pensamentos positivos diante de cada desafio e pelas sábias palavras diante de cada dificuldade. Vocês certamente são o meu porto seguro. Amo vocês.

Ao meu orientador **Professor Francisco de Assis de Paiva Campos** pelos ensinamentos, pela confiança, paciência e por ter me dado a oportunidade de fazer parte de sua equipe de pesquisa, contribuindo diretamente para o meu crescimento profissional.

Aos profs. componentes da banca examinadora: **Dr. José Hélio Costa, Dr. Fábio César Sousa Nogueira e Dr. Fabiano Moura Teixeira**, pela disponibilidade em participar da banca examinadora e pelas importantes sugestões que muito contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos grandes amigos do Bioplant: **Emanoella (a nossa manu), Antonio, Fabiano, Camila, Magda, Mohib, Verônica, Roberto, Ícaro e Derick**. Obrigado pelos conhecimentos adquiridos, paciência nos momentos difíceis, pelas boas risadas e principalmente pelo bom convívio durante o curso.

Aos amigos **Antonio Rocha, Fabiano Moura e Emanoella lima** pelas correções e sugestões apresentadas, contribuindo para o enriquecimento do meu trabalho. Obrigado.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A Secretaria de Educação do Estado do Ceará (**SEDUC**) por minha liberação para realização deste curso.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**FUNCAP**) pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (**DBBM**) da Universidade Federal do Ceará.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1	Pinhão manso .....	14
2.1.1	Aspectos Gerais .....	14
2.1.2	Composição química da semente .....	16
2.1.3	Toxicidade da semente .....	16
2.2	Biossíntese de ácidos graxos .....	19
2.3	Biossíntese e armazenamento de triacilgliceróis .....	21
2.4	Mobilização dos lipídios de reserva em sementes oleaginosas .....	23
2.5	Peculiaridades da biossíntese de lipídios em sementes oleaginosas .....	25
2.6	Utilização e importância da amplificação quantitativa em cadeia pela DNA polimerase de DNA oriundo de síntese pela transcriptase reversa (RT-qPCR) para o estudo da expressão gênica em plantas .....	26
<b>3.</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	28
3.1	Objetivos específicos .....	28
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
4.1.	Análise de expressão gênica por RT-PCR e RT-qPCR .....	29
4.1.1.	Material vegetal .....	29
4.1.2.	Extração e purificação de RNA total .....	29
4.1.3.	Quantificação e análise da integridade do RNA total .....	33
4.1.4.	Síntese de DNA complementar (cDNA) .....	33
4.1.5.	Síntese de iniciadores para análise de expressão gênica por RT-qPCR .....	33
4.1.6.	RT-PCR .....	36
4.1.7.	RT-qPCR .....	36
4.1.8.	Análises dos dados .....	37
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38
5.1.	Estabilidade de expressão dos genes de referência em sementes de <i>J. curcas</i> (L.) avaliados por RT- qPCR .....	38
5.1.1.	Validação dos genes de referência para RT-qPCR .....	44
5.2.	Análise da Expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios em sementes de <i>J. curcas</i> .....	45
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	74
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	75
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	87

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Aspectos gerais do pinhão manso ( <i>J. curcas</i> L.) .....	15
<b>Figura 2.</b> Estrutura do éster de forbol tetradecanoil forbol – 13 – acetato, derivado do tigliane (Modificado de EVANS, 1986) .....	18
<b>Figura 3.</b> Visão geral da biossíntese <i>de novo</i> dos ácidos graxos em vegetais (Modificado de BUCHANAN <i>et al.</i> , 2000).....	20
<b>Figura 4.</b> Visão geral da biossíntese de triacilgliceróis em vegetais .....	22
<b>Figura 5.</b> Visão geral da $\beta$ -oxidação (Modificado de LEHNINGER, 2011) .....	24
<b>Figura 6.</b> Sementes de pinhão manso em diferentes estágios de desenvolvimento .....	31
<b>Figura 7.</b> Sementes de pinhão manso em diferentes estágios de germinação .....	32
<b>Figura 8.</b> Classificação obtida pelos candidatos a genes de referência, com valores M fornecidos pelo geNorm referente aos estágios do desenvolvimento da semente de <i>J. curcas</i> .....	39
<b>Figura 9.</b> Classificação obtida pelos candidatos a genes de referência, com valores M fornecidos pelo geNorm referente aos estágios de germinação da semente de <i>J. curcas</i> .....	40
<b>Figura 10.</b> Gráfico dos valores V fornecido pelo geNorm para os nove candidatos à genes de referência para sementes em desenvolvimento de <i>J. curcas</i> .....	42
<b>Figura 11.</b> Gráfico dos valores V fornecido pelo geNorm para os nove candidatos à genes de referência para sementes em germinação de <i>J. curcas</i> .....	43
<b>Figura 12.</b> Padrão de expressão relativa do gene Oleosina (OLEO 3) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de <i>J. curcas</i> .....	46
<b>Figura 13.</b> Padrões de expressão relativa das subunidades do gene ACCase ( biotina carboxilase - A, proteína carreadora de biotina -B, $\alpha$ -carboxiltransferase - C) obtidos por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de <i>J. curcas</i> .....	48
<b>Figura 14.</b> Padrões de expressão relativa dos genes KAS I (A), KAS II (B) e KAS III (C) obtidos por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de <i>J. curcas</i> .....	51
<b>Figura 15.</b> Padrão de expressão relativa do gene $\beta$ -cetoacil-ACP redutase (KAR) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de <i>J. curcas</i> .....	53



<b>Figura 16.</b> Padrão de expressão relativa do gene Enoil-ACP redutase (EAR) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de <i>J. curcas</i> .....	55
<b>Figura 17.</b> Padrões de expressão relativa dos genes FatA (A) e FatB (B) obtidos por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de <i>J. curcas</i> .....	57
<b>Figura 18.</b> Padrão de expressão relativa do gene Diacilglicerol aciltransferase (DGAT) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de <i>J. curcas</i> .....	59
<b>Figura 19.</b> Padrões de expressão relativa dos genes TAG I (A) e TAG II (B) obtidos por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de <i>J. curcas</i> . ....	61
<b>Figura 20.</b> Padrão de expressão relativa do gene Acil-CoA sintetase de cadeia longa (LACS) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de <i>J. curcas</i> .....	63
<b>Figura 21.</b> Padrão de expressão relativa do gene Acil-CoA oxidase (ACX) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de <i>J. curcas</i> .....	64
<b>Figura 22.</b> Padrão de expressão relativa do gene Enoil-CoA hidratase (ECH) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de <i>J. curcas</i> .....	67
<b>Figura 23.</b> Padrão de expressão relativa do gene $\beta$ - cetoacil-CoA tiolase (KAT) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de <i>J. curcas</i> .....	68
<b>Figura 24.</b> Padrão de expressão relativa do gene Dienoil-CoA redutase (DECR) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de <i>J. curcas</i> .....	70
<b>Figura 25.</b> Padrão de expressão relativa do gene Acetil-CoA acetiltransferase (ACAT) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de <i>J. curcas</i> .....	72
<b>Quadro 1.</b> Caracterização morfológica dos estágios de sementes de <i>J. curcas</i> em desenvolvimento utilizados nas análises de expressão gênica .....	30

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Genes de referência utilizados nos estudos de normalização por RT-qPCR de *J. curcas*, sequência dos iniciadores e tamanho do produto amplificado..... 34
- Tabela 2.** Genes do metabolismo de lipídios utilizados nas análises de expressão por RT-qPCR de *J. curcas*, sequência dos iniciadores e tamanho do produto amplificado ..... 35

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

μg – micrograma (s)

μL – microlitro (s)

μM – micromolar

cDNA – DNA complementar

cm – centímetros

Ct – Cycle threshold

DAE – Dias após a embebição

DEPC – Diethylpyrocarbonate (Dietilpirocarbonato)

dNTP – Desoxirribonucleotídeo trifosfato

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio

Água Milli Q – Água destilada deionizada

NCBI – National Center for Biotechnology Information

nm – nanômetro (s)

pb – Pares de bases

RT-PCR – Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction

RT-qPCR – Reverse Transcriptase – Quantitative Polimerase Chain Reaction

*Taq* – *Thermus aquaticus*

U – unidades

WGS – Whole-genome shotgun contigs

ng – nanograma (s)

## RESUMO

O esgotamento das reservas de energia não-renovável, como petróleo, carvão e gás natural, têm estimulado a busca por fontes alternativas geradoras de energia. Neste contexto, o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) tem recebido especial atenção por parte dos pesquisadores, devido à presença de grande quantidade de óleo em suas sementes, que pode ser convertida em biodiesel. O objetivo deste trabalho foi investigar o comportamento de genes relacionados ao metabolismo de lipídios durante os processos de desenvolvimento e germinação da semente de pinhão manso. Para quantificar com exatidão os níveis de expressão gênica por RT-qPCR foi feita uma seleção entre nove candidatos a genes de referência. Nossos resultados mostraram que na análise de sementes em desenvolvimento, os genes GAPDH, UCP, ACT11, PP2A2 e CICLOF foram os mais estáveis. Para as sementes em germinação, os genes considerados mais estáveis foram EF1- $\alpha$ , PP2A2, GAPDH, PUB3 e ACT11. Para validar nossos resultados com genes de referência, foi utilizado o padrão de expressão do gene que codifica a proteína oleosina no qual foi observado que o mesmo foi similar aos observados em artigos científicos pesquisados, indicando que os genes de referência estavam apropriados para normalização dos dados de RT-qPCR. Após obtenção desses dados, efetuou-se um estudo da expressão por RT-qPCR de 20 genes envolvidos com o metabolismo de lipídios. Nossos resultados revelaram que os genes oleosina,  $\beta$ -cetoacil-ACP Sintase I e II, tioesterase A e triacilglicerol lipase I, bem como outros genes envolvidos na biossíntese de lipídios, alcançaram altos níveis de expressão no desenvolvimento da semente. Os genes acil-CoA sintetase, tiolase e triacilglicerol lipase II, relacionados com a degradação de lipídios apresentaram altos níveis de transcritos na germinação da semente. Os dados obtidos neste trabalho contribuem para o entendimento das vias metabólicas estudadas, fornecendo subsídios para a produção, via engenharia genética, de variedades melhoradas do pinhão manso.

Palavras-chave: Expressão gênica. Genes de referência. Normalização.

## ABSTRACT

The depletion of non-renewable energy such as oil, coal and natural gas, has stimulated the search for alternative sources of energy generation. In this context, physic nut (*Jatropha curcas* L.) has received special attention from researchers due to the presence of large amounts of oil in its seeds that can be converted into biodiesel. The objective of this study was to investigate the behavior of genes related to lipid metabolism during the development and germination of physic nut seeds. To accurately quantify the levels of gene expression by RT-qPCR, a selection of nine candidates for reference genes was performed. Our results showed that the GAPDH, UCP, ACT11, PP2A2 and CICLOF were the most stable genes during the development of the seeds. In germinating seeds, EF1- $\alpha$ , PP2A2, GAPDH, PUB3 and ACT11 were considered the most stable genes. To validate our findings with reference genes, we used the expression profile of the gene encoding the oleosin protein in which that was similar to those observed in the literature evaluated, indicating that they were suitable reference genes for data normalization by RT-qPCR. After obtaining these data, we performed a gene expression study by RT-qPCR of 20 genes involved in lipid metabolism. Our results revealed that the oleosin,  $\beta$ -ketoacyl-ACP Synthase I and II, thioesterase A and triacylglycerol lipase I genes, as well as other genes involved in lipid biosynthesis, achieved high expression levels in developing seeds. Acyl-CoA synthetase, thiolase and triacylglycerol lipase II, genes related to the degradation of lipids, showed high transcript levels in germinating seeds. The data obtained in this study contribute to the understanding of the metabolic pathways studied, providing subsidies for production of improved varieties of physic nut via genetic engineering.

Keywords: Gene expression. Reference genes. Normalization.

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de biocombustíveis derivados de espécies de plantas como importante fonte de energia renovável é um conceito com grande relevância para as atuais questões ecológicas e econômicas, seja no âmbito nacional ou global. O interesse por biocombustíveis como alternativa ao combustível fóssil deve-se principalmente ao aumento do preço do petróleo, diminuição das reservas de petróleo, aquecimento global, entre outras (MUKHERJEE *et al.*, 2011). Neste contexto, o pinhão manso (*Jatropha curcas*) é visto como um candidato em potencial entre as fontes de energia renováveis por possuir características peculiares (OPENSHAW, 2000) recebendo enorme atenção em todo mundo por apresentar sementes com teor de óleo entre 40 - 55% (XIAO *et al.*, 2011), sendo considerada uma planta com grande capacidade para a produção de biodiesel.

O pinhão manso (*J. curcas*) é uma planta pertencente à família das Euforbiáceas, nativa da América tropical sendo encontrada em grande escala nas regiões tropical e subtropical da África e Ásia (OPENSHAW, 2000; DIVAKARA *et al.*, 2010). A planta é vigorosa, tolerante a seca e a pragas (PANDEY *et al.*, 2012), com rápido crescimento e fácil propagação (ACHTEN *et al.*, 2008), podendo ainda ser utilizada como cerca viva (OPENSHAW, 2000). Tradicionalmente, as sementes do pinhão e outras partes da planta têm sido usadas como matéria-prima na produção de óleo, sabão e compostos medicinais (MISRA; MISRA, 2010). Outros subprodutos podem ser obtidos com a extração e beneficiamento do óleo, no caso glicerol e a torta (PARAWIRA, 2010). Não obstante, a presença de vários componentes tóxicos como a curcina e os ésteres de forbol em folhas e sementes podem representar riscos para a saúde (YE *et al.*, 2009). Apesar de todo potencial, o pinhão manso é uma planta não domesticada e desconhecida cientificamente, necessitando de estudos que viabilizem a sua cultura como uma importante alternativa aos agricultores do País (FERRARI *et al.*, 2009).

Em plantas, os lipídios armazenados são a principal fonte de matéria prima para a produção de biodiesel. Os lipídios são sintetizados e degradados através de vias metabólicas complexas nas quais muitas enzimas estão envolvidas. Embora as vias para a síntese de ácidos graxos e lipídios sejam conhecidas, pouco se sabe como as plantas regulam as quantidades e os tipos de lipídios a serem produzidos em diferentes tecidos e órgãos, especialmente em sementes (GU *et al.*, 2012). A degradação de lipídios através

da  $\beta$ -oxidação é essencial para a planta. Estudos com mutantes têm revelado que a  $\beta$ -oxidação tem papel essencial no desenvolvimento e germinação da semente, além do crescimento pós-germinativo antes do estabelecimento da fotossíntese (GOEPFERT; POIRIER, 2007). Investigar a base molecular do metabolismo de lipídios (triacilgliceróis) e dos genes envolvidos na produção de toxinas é um pré-requisito essencial para a compreensão dos fatores genéticos responsáveis pela regulação da biossíntese e armazenamento de lipídios em sementes de pinhão manso, para só então produzir variedades melhoradas por engenharia genética.

Este trabalho foi fundamentado na análise do padrão de expressão dos principais genes envolvidos no metabolismo de lipídios presentes em diferentes estágios do desenvolvimento e germinação da semente de *J. curcas*.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Pinhão Manso**

#### **2.1.1 Aspectos Gerais**

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta pertencente à família das Euforbiáceas, nativa da América tropical sendo encontrada em grande escala nas regiões tropical e subtropicais da África e Ásia (OPENSHAW, 2000; DIVAKARA *et al.*, 2010). O pinhão manso (Figura 1) se estabelece facilmente, por ser resistente e crescer rapidamente. Esta planta tem grande potencial econômico e importância ecológica e ambiental (RAO *et al.*, 2008) apresentando várias utilidades como prevenção e/ou controle da erosão, recuperação de áreas degradadas, como cerca viva ou ser cultivada como uma cultura comercial, pois o óleo produzido por sua semente é utilizada como matéria-prima na produção de biocombustíveis (OPENSHAW, 2000). Além disso, o pinhão manso é utilizado como matéria-prima na fabricação de vários produtos, incluindo sabões, cosméticos, biopesticidas e fertilizantes (MISRA e MISRA, 2010) e ainda, a partir dos resíduos resultantes da extração do óleo da semente fabrica-se a torta que é utilizada como adubo orgânico, rico em nitrogênio, fósforo e potássio (OPENSHAW, 2000; PARAWIRA, 2010).

A biomassa como fonte de energia renovável é fundamental para o futuro da civilização. Devido ao crescente interesse por fontes de energia renováveis, a produção de biocombustíveis a partir de óleos vegetais tem sido visto como uma excelente opção (MUKHERJE *et al.*, 2011). Dentre outras vantagens os óleos vegetais, apresentam baixo teor de enxofre e de aromáticos (KOH e GHAZI, 2011). O óleo extraído da semente do pinhão manso apresenta boas propriedades como baixa acidez, boa estabilidade em relação ao óleo de soja, baixa viscosidade em comparação ao óleo de mamona (KOH e GHAZI, 2011), além de não ser comestível o que evitaria uma “competição” entre destinar óleos comestíveis como o de soja, milho, girassol, etc., para a produção de biodiesel ou consumo humano.

Embora o pinhão manso apresente inúmeras características para o uso como matéria-prima, existem barreiras para que isso ocorra, pois esta planta nunca foi domesticada. As condições para um melhor crescimento por parte da planta não estão definidas e o impacto ambiental do cultivo em larga escala não é conhecido (CARELS, 2009). Diante do exposto, a utilização do pinhão manso como fornecedor de matéria-prima esta condicionada a pesquisas que resultem na domesticação da mesma para que





Figura 1. Aspectos gerais do pinhão manso (*J. curcas* L.). Disponível em: <http://www.sindrof.com.br/pinhao-manso/>

num futuro próximo, essa oleaginosa atenda as expectativas, sendo entre outras uma importante fornecedora de óleo para a produção de biocombustível.

### **2.1.2 Composição química da semente**

O pinhão manso tem sido indicado como matéria-prima promissora, pois apresenta sementes com teor de óleo entre 40 e 55% (XIAO *et al.*, 2011). Esta planta, segundo Akbar *et al.*,(2009), tem o óleo formado principalmente por ácidos graxos monoinsaturados (45,4%),seguidos dos poliinsaturados (33%) e ácidos graxos saturados (21,6%), tendo como principais os ácidos graxos oléico (42,8%), linoléico (32,8%), palmítico (14,2%) e esteárico (7,0%) , sendo que o óleo ainda possui boas propriedades físico-químicas.

Além da grande quantidade de ácidos graxos, a semente de pinhão manso também possui alto teor de proteínas com cerca de 24,60% (AKINTAYO, 2004). Esse teor de proteína encontrada na semente tem gerado interesse para o uso da torta ou do farelo resultantes da extração do óleo para alimentação animal, pois a quantidade de aminoácidos essenciais encontrados no farelo da semente, com exceção para a lisina é maior que o estabelecido pela FAO (Food and Agriculture Organization) para uma criança em crescimento com idade entre dois e cinco anos (MAKKAR e BECKER, 1997). No entanto a presença de constituintes tóxicos e fatores antinutricionais devem ser levados em consideração (FERRARI *et al.*, 2009).

### **2.1.3 Toxicidade da Semente**

A natureza tóxica do óleo e da torta do pinhão manso tem sido abordada em vários estudos com animais como, por exemplo: camundongos (ADAM, 1974), bezerros (AHMED; ADAM, 1979), ovinos e caprinos (AHMED; ADAM, 1979) dentre outros. Em humanos há relatos de intoxicação por consumo acidental de sementes com a vítima apresentando sintomas como tontura, vômito e diarreia (BECKER; MAKKAR, 1998). Além dos componentes tóxicos, alguns compostos antinutricionais como saponina, fitato, inibidor de tripsina, glucosinolatos, inibidores de amilase, flavonóides, vitexina, isovitexina dentre outros foram relatados na semente do pinhão (MAKKAR *et al.*, 1997).

Os principais componentes tóxicos da semente são a curcina (LIN *et al.*, 2003) e os ésteres de forbol (ADOLF *et al.*, 1984). Felke (1914) foi o primeiro a isolar e

identificar o princípio tóxico da curcina. Esta proteína é classificada como uma RIP (proteína inativadora de ribossomo) do tipo I com atividade N-glicosidase. Essas proteínas clivam a ligação glicosídica de uma adenina em uma sequência conservada evolutivamente (GAGA) localizada no ribossomo eucariótico (ZHAO, 2012). As RIPs do tipo I são proteínas de cadeia simples, com peso molecular entre 28kD e 35kD, que possuem ponto isoelétrico alcalino e pH entre 8 e 10 (LIN *et al.*, 2003). Estudos recentes mostram que a curcina exibe várias atividades biológicas e farmacológicas, tais como atividades antitumoral, (LIN *et al.*, 2003), pesticida (LIANG *et al.*, 2005) e antifúngicas (WEI *et al.*, 2004).

A curcina foi associada à ricina, uma proteína tóxica da mamona (*Ricinus communis*) por Stirpe (1976). No entanto, esta associação é incerta, pois a ricina é uma RIP do tipo II que possui o domínio catalítico e o domínio lectínico de ligação a carboidratos, ambos codificados pelo mesmo gene (HARTLEY; LORD, 2004), enquanto que RIPs do tipo I como a curcina não possuem esse domínio lectínico. A toxicidade das RIPs tipo II, como a ricina é parcialmente atribuída pela habilidade do domínio lectínico se ligar a superfícies celulares e mediar à entrada da RIP para o interior da célula (KING, *et al.*, 2009). Devido à falta do domínio lectínico as RIPs do tipo I como a curcina são menos tóxicas que as RIPs do tipo II.

Os ésteres de forbol são considerados os principais responsáveis pela toxicidade da semente do pinhão manso. Ésteres de forbol são compostos naturais, amplamente distribuídos entre espécies vegetais pertencentes às famílias *Euphorbiaceae* e *Thymeleaceae* e sua estrutura é baseada em um esqueleto de carbono tetracíclico conhecido como tigliane conforme observado na figura 2 (EVANS, 1986). Seis tipos de ésteres de forbol têm sido relatados em *J. curcas* (HAAS *et al.*, 2002). Os mesmos são responsáveis por irritações de pele e promoção de tumores, pois mimetizam a ação do diacilglicerol, um ativador da PKC (proteína kinase C), a qual está envolvida na tradução de sinais e processos de desenvolvimento de várias células e tecidos, produzindo uma variedade de efeitos biológicos (GOEL *et al.*, 2007; NITHIYANANTHAM *et al.*, 2012). Apesar de apresentar efeitos negativos para a saúde humana e animal, os ésteres de forbol possuem alguns efeitos benéficos, pois estudos têm demonstrado que os mesmos possuem atividades inseticida (WINK *et al.*, 1997), moluscicida (LIU *et al.*, 1997) fungicida e bacteriana (DEVAPPA *et al.*, 2012). Porém para a utilização dos mesmos na agricultura (como biopesticida ou inseticida) ou no controle de doenças (como antimicrobiano), o destino dos ésteres de

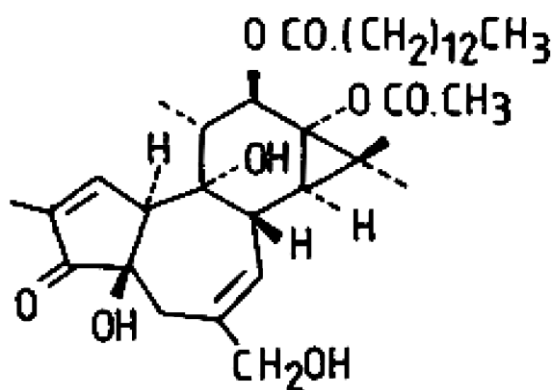
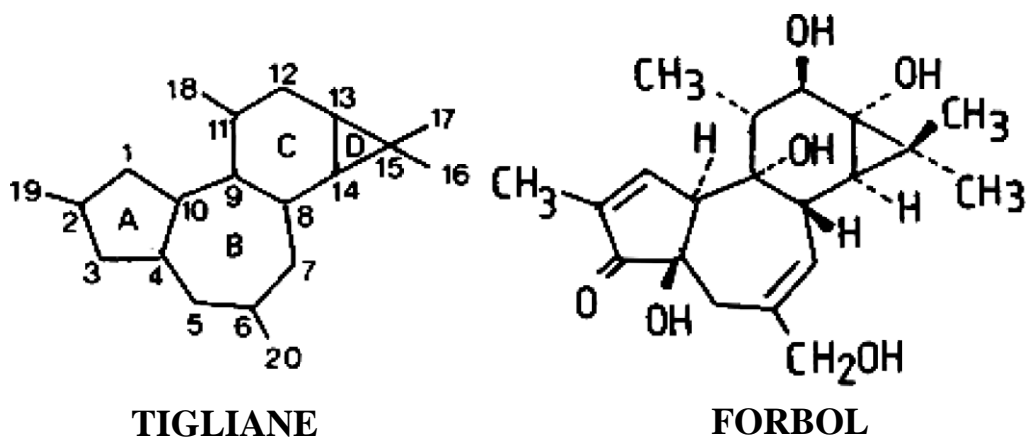


Figura 2. Estrutura do éster de forbol tetradecanoil forbol – 13 – acetato, derivado do tigliane (Modificado de EVANS, 1986).

forbol em solo, água e plantas e os potenciais riscos ambientais devem ser analisados e levados em consideração (GOEL *et al.*, 2007).

## 2.2 Biossíntese de ácidos graxos

Os ácidos graxos são componentes essenciais para as plantas e necessários para o desenvolvimento normal das mesmas. Estudos têm demonstrado a importância dos ácidos graxos no desenvolvimento da planta, sinalização celular e resposta ao estresse (WU; XUE, 2010). A biossíntese *de novo* dos ácidos graxos (Figura 3) ocorre nos plastídios e as enzimas participantes deste processo são componentes solúveis dissociáveis (OHLROGGE; BROWSE, 1995).

Nas plantas, dois conjuntos de enzimas são responsáveis pela biossíntese de ácidos graxos: acetil-CoA carboxilase (ACCase) e ácido graxo sintase (AGS). A ACCase catalisa a formação de malonil-CoA a partir de acetil-CoA e bicarbonato em uma reação dependente de ATP (SASAKI; NAGANO, 2004), no entanto, antes de participar da biossíntese de ácidos graxos o malonil-CoA é transferido para um cofator protéico denominado, proteína carreadora de acil (ACP) e só então entra nas reações de condensação (OHLROGGE; BROWSE, 1995). A ACCase possui duas formas fisicamente distintas encontradas na natureza: as formas heteromérica e homomérica. A forma heteromérica é composta por quatro subunidades: proteína carreadora de biotina (BCCP), biotina carboxilase (ACC), subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da carboxiltransferase (CAC), e é usualmente presente em procariotos. A forma homomérica é composta por um grande polipeptídeo com quatro domínios e está presente nos eucariotos. Ambas as formas são encontradas em várias espécies de plantas (SASAKI; NAGANO, 2004). O conjunto de enzimas AGS é classificado em dois grupos baseados na organização e forma estrutural. O AGS formado por um ou dois polipeptídeos multifuncionais é classificado como sendo do “tipo I” e ocorre no citoplasma de animais e leveduras, enquanto que o AGS que é composto por enzimas monofuncionais é classificado como do “tipo II” e ocorre em bactérias e plastídios de plantas (GONZÁLES-MELLADO *et al.*, 2010).

A primeira etapa de alongação é catalisada pela  $\beta$ -cetoacil-ACP Sintase III (KAS III), produzindo 3-cetobutiril-ACP a partir de acetil-CoA e malonil-ACP (JACKOWSKI *et al.*, 1994). Três reações adicionais ocorrem após cada etapa de alongação, sendo estas catalisadas pelas enzimas  $\beta$ -Cetoacil-ACP redutase,  $\beta$ -hidroxiacil- ACP desidratase e

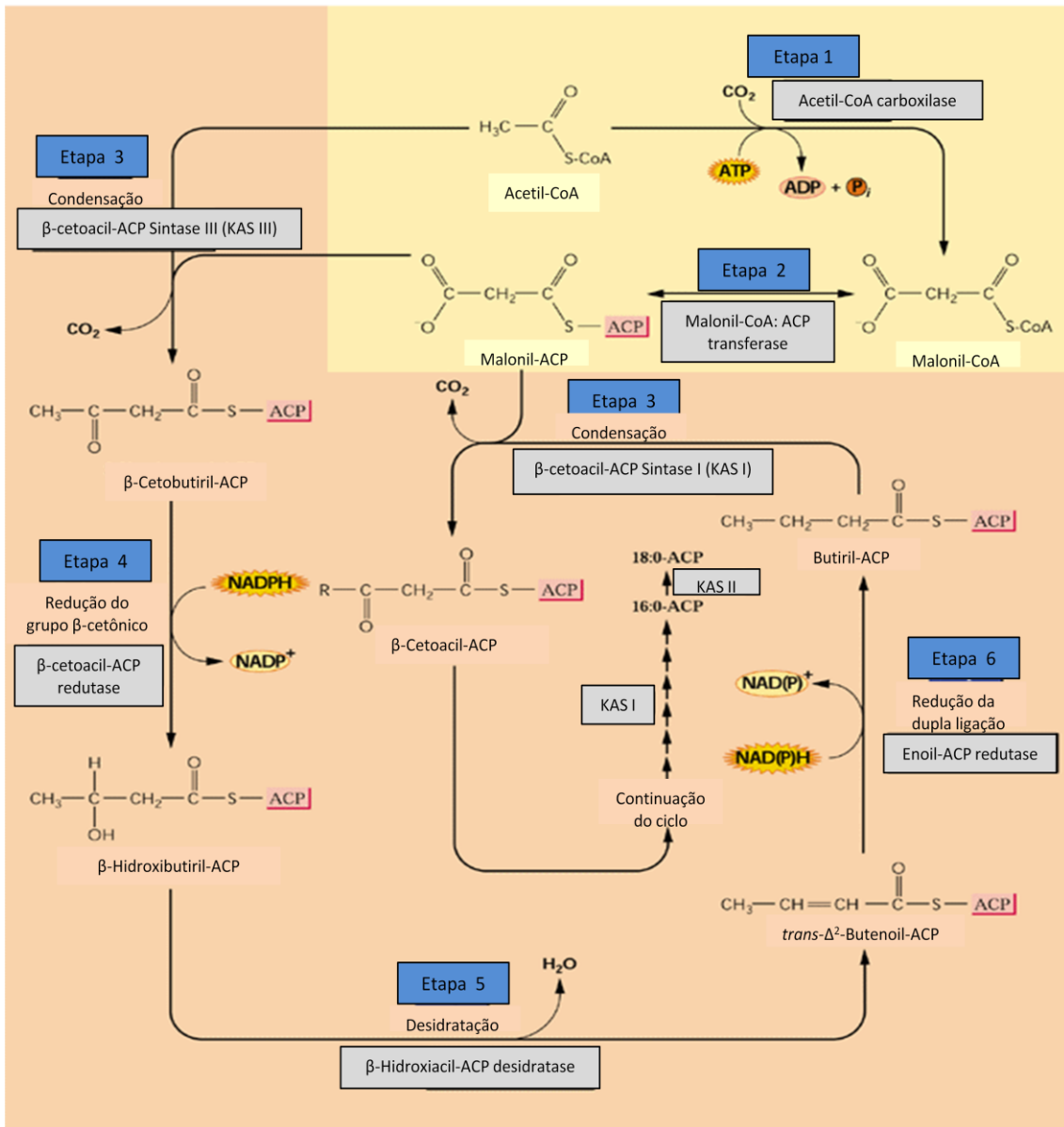


Figura 3. Visão geral da biosíntese *de novo* dos ácidos graxos em vegetais (Modificado de BUCHANAN *et al.*, 2000).

enoil-ACP redutase (OHLROGGEE; JAWORSKI, 1997). As etapas subsequentes de condensação para a elongação são realizadas pelas enzimas KAS I e KAS II, produzindo ácidos graxos de 16C e 18C respectivamente (GONZÁLES-MELLADO *et al.*, 2010).

A biossíntese de ácidos graxos produz ácidos graxos saturados, no entanto, em muitos tecidos de plantas, cerca de 75% dos ácidos graxos são insaturados (OHLROGGE; BROWSE, 1995). As insaturações são acrescentadas por dessaturases, que realizam a conversão de uma ligação simples entre dois átomos de carbono (C-C) em uma dupla ligação (C=C) na cadeia acil graxo (BANIK *et al.*, 2011). Os produtos resultantes da ação das dessaturases são ácidos graxos poliinsaturados, que são essenciais para a manutenção das funções biológicas e fluidez da membrana (OHLROGGE; BROWSE, 1995). O término da biossíntese de ácidos graxos é catalisado por Acil-ACP tioesterases (Fat) que por hidrólise da ligação tioester clivam a molécula acil-ACP (WU *et al.*, 2009). Os produtos dessa reação são o ACP, que é reciclado para outras sínteses de acil-ACP e ácidos graxos livres que são exportados para o citosol, onde formam acil-CoAs pela ação da enzima acil-CoA sintetase (KOO *et al.*, 2004). Os acil-CoAs produzidos são substratos para a síntese de lipídios de membrana e de armazenamento (PLEITE *et al.*, 2006).

### **2.3 Biossíntese e armazenamento de triacilgliceróis**

Os triacilgliceróis (TAG) têm múltiplas funções nos organismos vivos, mas servem principalmente como reserva de ácidos graxos para a produção de energia (LIU *et al.*, 2012). Em plantas, estas moléculas são os principais componentes das sementes oleaginosas (YEN *et al.*, 2008) permitindo o crescimento pós-germinativo da plântula até o estabelecimento eficiente da fotossíntese (BAUD; LEPINIEC, 2009). TAGs são formados por um éster de glicerol ligado a três grupos de ácidos graxos (grupos acil). TAGs simples possuem três grupos acil idênticos, enquanto que os TAGs mistos contêm dois ou três grupos acil diferentes (KARANTONIS *et al.*, 2009). Alguns dos ácidos graxos encontrados nos TAGs estão também presentes em lipídios de membrana. Estes são predominantemente palmitato (16:0), estearato (18:0), oleato (18:1), linoléico (18:2) e linolênico (18:3), no entanto, centenas de outros ácidos graxos têm sido encontrados nos TAGs (VOLKER; KINNEY, 2001).

A biossíntese dos TAGs (Figura 4) ocorre no retículo endoplasmático e utiliza

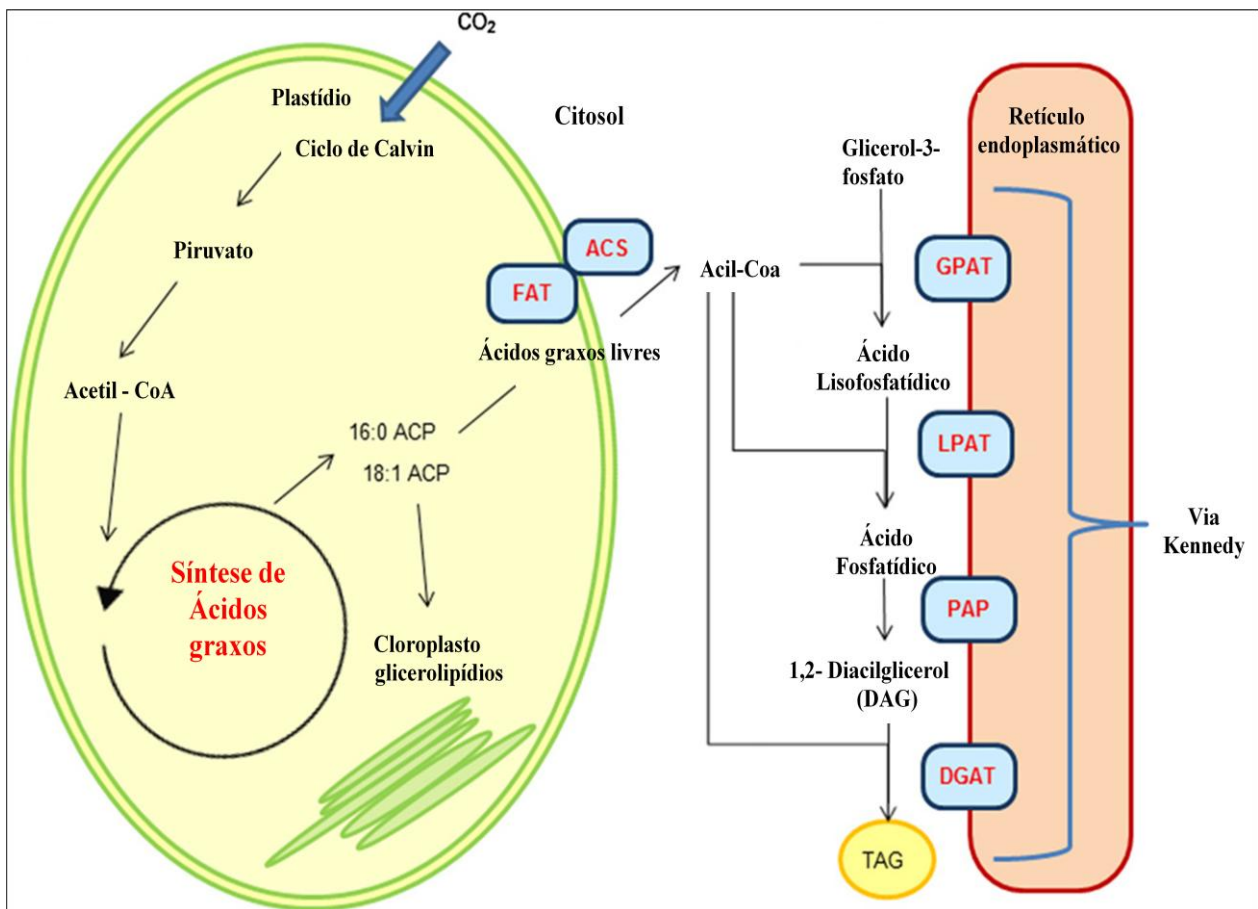


Figura 4. Visão geral da biossíntese de triacilgliceróis em vegetais (Modificado de CHEN; SMITH, 2012).



como substrato glicerol-3-fosfato (G3P) e acil-CoAs (BAUD; LEPINIEC, 2010). Os acil-CoAs provenientes de biossíntese de ácidos graxos e de outras fontes, são usados em acilações sequenciais do G3P nas posições *sn-1* e *sn-2* para produzir ácido fosfatídico (PA). O PA é então convertido em 1,2-*sn*-diacilglicerol (DAG) pela ação da PA fosfatase (BATES *et al.*, 2009). Por fim os DAGs passam pela via Kennedy, onde o terceiro ácido graxo é transferido para a posição *sn-3* pela ação da 1,2-*sn*-diacilglicerol aciltransferase (DGAT) produzindo o TAG (BAUD; LEPINIEC, 2010).

Os TAGs produzidos são armazenados em organelas esféricas intracelulares com diâmetro entre 0,6 e 2  $\mu\text{m}$ , envolvidas em uma monocamada de fosfolipídios contendo proteínas incorporadas que estabilizam sua estrutura (HUANG, 1992). A proteína predominante nos oleossomos é a oleosina, que entre outras funções previne a coalescência desta durante a dissecação da semente (PARTHIBANE *et al.*, 2012).

#### **2.4 Mobilização dos lipídios de reserva em sementes oleaginosas**

A transição de semente para plântula é uma etapa importante no ciclo de vida das plantas, sendo que em espécies com sementes oleaginosas esta etapa é alimentada pela degradação de TAGs armazenados em oleossomos (THEODOULOU; EASTMOND, 2012). A mobilização do óleo armazenado envolve a indução coordenada de vias bioquímicas em diferentes localizações subcelulares. Classicamente a primeira etapa na quebra do óleo é catalisada por lipases que hidrolisam TAGs para produzir ácidos graxos livres e glicerol (HUANG, 1992). No entanto, estudos têm sugerido que proteases e fosfolipases podem proporcionar o acesso de lipases ao seu substrato, a partir da hidrólise de proteínas e fosfolipídios que revestem a superfície dos oleossomos (BHATLA *et al.*, 2009). Segundo Graham (2008), as longas cadeias de ácidos graxos liberados pela lipólise de TAGs são ativadas no citosol através da atividade da enzima Acil-CoA sintetase de cadeia longa (LACS) e transportadas como ésteres de acil-CoAs para os peroxissomos pela ação da proteína de transporte ABC (cassete de ligação ao ATP, ATP-binding cassette).

Após o transporte para os peroxissomos, as cadeias de acil-CoA ativadas irão atuar como substratos no processo da  $\beta$ -oxidação (Figura 5). A  $\beta$ -oxidação é a principal via de degradação dos ácidos graxos nos peroxissomos (GOEPFERT; POIRIER, 2007). Essa via envolve a atividade sequencial das enzimas acil-CoA oxidase (ACX), seguido pela a enoil-CoA hidratase (ECH) e  $\beta$ -hidroxiacil-CoA desidrogenase (ambas as

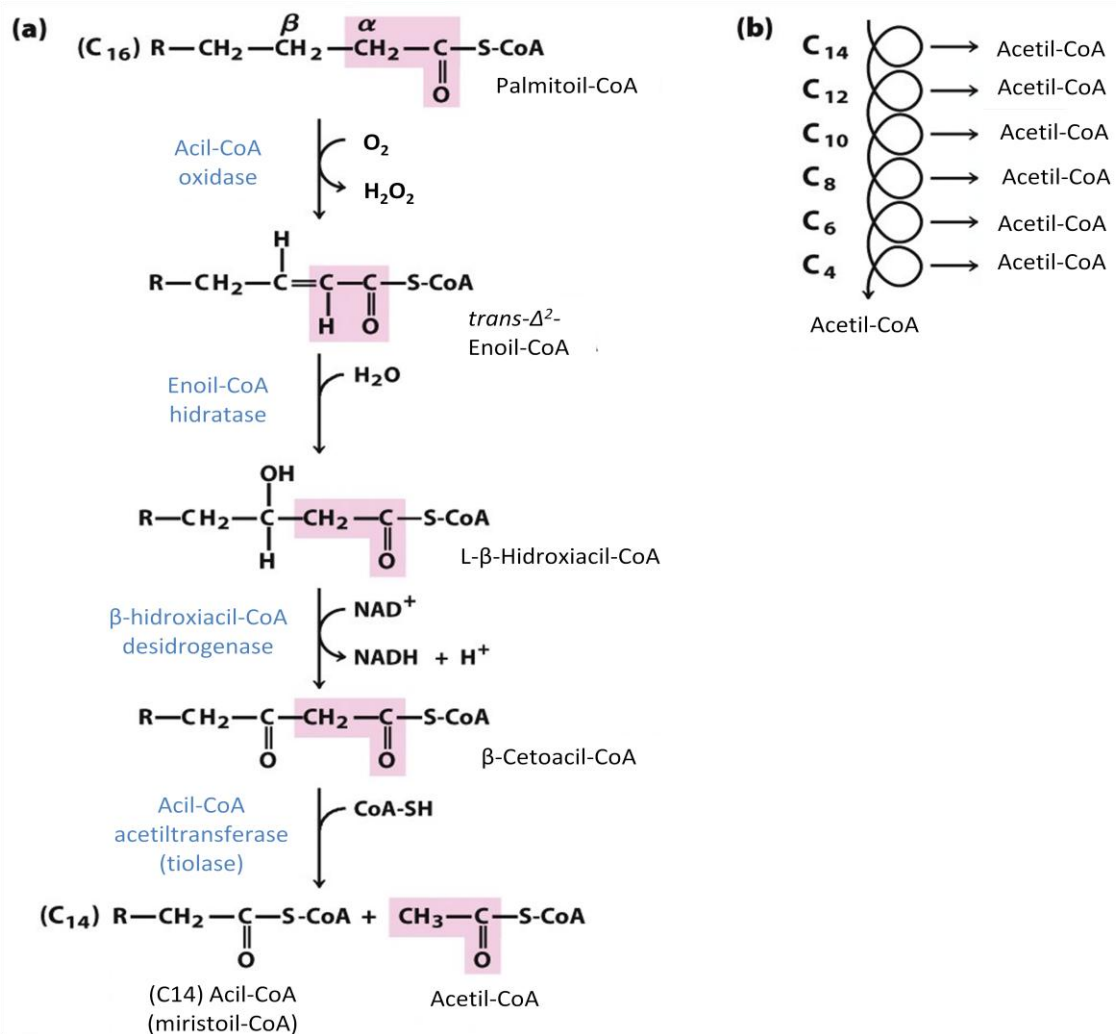


Figura 5. Visão geral da  $\beta$ -oxidação. (a) Em cada passagem pela via um resíduo de acetil na forma de acetil-CoA é removido da cadeia do ácido graxo - neste exemplo o palmitato (C16). (b) Mais seis passagens pela via produzem sete moléculas de acetil-CoA. No total são produzidas oito moléculas de acetil-CoA (Modificado de LEHNINGER, 2011).

atividades da proteína multifuncional - MFP) e  $\beta$ - cetoacil-CoA tiolase (KAT), que catalisam oxidação, hidratação/desidrogenação e clivagem tiolítica, respectivamente (THEODOULOU; EASTMOND, 2012). A cada volta do processo, duas unidades de carbono na forma de acetil-CoA são repetidamente clivadas a partir da molécula de acil-CoA (GRAHAM, 2008).

Os principais produtos gerados pela  $\beta$ -oxidação são o  $H_2O_2$ , NADH e acetil-CoA. O  $H_2O_2$  é produzido na reação catalisada pela acil-CoA oxidase, no entanto este é logo metabolizado pela enzima catalase. No entanto, quando ocorre alta produção de  $H_2O_2$ , como exemplo, durante a mobilização de TAGs no crescimento inicial da plântula, um sistema ligado a membrana formado pelas enzimas ascorbato peroxidase (APX) e monodehidroascorbato redutase (MDAR) atuam como uma segunda linha de defesa para impedir que  $H_2O_2$  chegue ao citosol da célula (HU *et al.*, 2012). O NADH é produzido pela atividade da hidroxiacil-CoA dehidrogenase, sendo re-oxidado fora dos peroxissomos, pois a organela é impermeável ao NAD(H) (GRAHAM, 2008).

O acetil-CoA produzido é metabolizado via ciclo do glioxilato gerando ácidos orgânicos de quatro carbonos: malato e succinato (GRAHAM, 2008). O ciclo do glioxilato é semelhante ao ciclo do ácido tricarboxílico, no entanto, distingui-se deste pela presença de duas enzimas exclusivas, no caso, isocitrato liase (ICL) e malato sintase (MLS). Estes compostos podem ser utilizados pela gliconeogênese para produção de açúcares (THEODOULOU; EASTMOND, 2012) e subsequentemente utilizados na biossíntese da parede celular, ou convertidos em sacarose e transportada para o tecido em crescimento da plântula (CANVIN; BEEVERS, 1961).

## **2.5 Peculiaridades da biossíntese de lipídios em sementes oleaginosas**

As plantas que produzem sementes oleaginosas diferenciam-se das outras por possuírem algumas características próprias. Em oleaginosas, tais como *Brassica napus* L. e *Arabidopsis*, os lipídios de reserva e proteínas de armazenamento são principalmente sintetizados durante a fase de enchimento da semente em desenvolvimento (RUUSKA *et al.*, 2002). Basicamente todas as cadeias acil utilizadas na formação da membrana celular e síntese de lipídios de armazenamento são produzidas nos plastídios (OHLROGGE; BROWSE, 1995). No entanto, em oleaginosas, esses grupos acil são usados quase que completamente (>95%) pelas vias extraplastidiais de síntese dos glicerolipídios (OHLROGGE; BROWSE, 1995).

A biossíntese e acúmulo de lipídios de reserva em sementes oleaginosas a partir de açúcar envolvem centenas de enzimas atuando em várias vias metabólicas (JIANG *et al.*, 2012). O fluxo comum para a síntese de lipídios em oleaginosas inclui a absorção de açúcares pelas células que compõe a semente, sua quebra através das vias glicolíticas citosólica e plastidial, além da troca de intermediários entre o citosol e organelas (tais como plastídios e o retículo endoplasmático), rotatividade do amido, malonil-CoA e síntese de ácidos graxos, montagem dos triacilgliceróis e formação dos oleossomos (FISCHER; WEBER, 2002).

A síntese “de novo” de ácidos graxos requer quantidades estequiométricas de ATP, NADPH e NADH para cada sequência adicional de uma unidade de acetil para o crescimento da cadeia de ácido graxo. O ATP é requerido para a carboxilação do acetil-CoA em malonil-CoA pela acetil CoA carboxilase, enquanto que duas redutases do complexo ácido graxo sintase, no caso  $\beta$ -cetoacil-ACP redutase e enoil-ACP redutase, utilizam NADPH e NADH, respectivamente. Plastídios de oleaginosas importam ATP, NADPH e NADH ou os produzem internamente. No entanto, a importação de equivalentes redutores ou ATP produzidos na mitocôndria ou citosol requer transportadores especializados que têm sido pouco estudados em oleaginosas (RAWSTHORNE, 2002).

## **2.6 Utilização e importância da amplificação quantitativa em cadeia pela DNA polimerase de DNA oriundo de síntese pela transcriptase reversa (RT-qPCR) para o estudo da expressão gênica em plantas**

A análise da expressão de genes é um passo importante para a compreensão das funções desempenhadas pelos genes no desenvolvimento e metabolismo celular das plantas tais como as etapas de sinalização e vias metabólicas (HU *et al.*, 2009). A RT-qPCR é um método amplamente utilizado para quantificar as alterações nos perfis de expressão de genes em resposta a diferentes condições ambientais (ZHU *et al.*, 2012) por apresentar características importantes como: exatidão, precisão e relativa facilidade de uso, devido a sua velocidade, sensibilidade e especificidade (BUSTIN, 2002). No entanto, fatores como estabilidade, qualidade e quantidade de RNA, eficiência da transcrição reversa e reações de PCR podem influenciar nos resultados dos testes por RT-qPCR (UDVARDI, *et al.*, 2008). Portanto, a utilização de uma estratégia de normalização apropriada é de importância crucial para a aquisição de dados biológicos significativos (ZHU *et al.*, 2012).

Entre os vários métodos propostos para normalização (HUGGETT *et al.*, 2005), genes de referência são os mais utilizados para normalizar os dados de RT-qPCR e para controle dos possíveis erros experimentais gerados na quantificação da expressão de genes, uma vez que os genes de referência são expostos às mesmas etapas de preparação como o gene de interesse (TONG, *et al.*, 2009). Um gene de referência ideal deve apresentar um nível de expressão estável em várias condições experimentais, tais como estímulos externos, estágios de desenvolvimento da planta e tipos de tecidos utilizados (BANDA, *et al.*, 2008).

Genes relacionados com o metabolismo básico e manutenção da célula são comumente utilizados como genes de referência (ZHU, *et al.*, 2012). No entanto, estudos recentes têm demonstrado que alguns desses genes de referência não são expressos de forma estável sob diferentes condições experimentais (GUTIERREZ, *et al.*, 2008). Portanto, os genes de referência devem ser validados para cada condição experimental (SCHMITTGEN; ZAKRAJSEK, 2000). Vários algoritmos tais como geNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002), NormFinder (ANDERSEN *et al.*, 2004), BestKeeper (PFAFFL *et al.*, 2004), qBasePlus (HELLEMANS *et al.*, 2007) foram desenvolvidos no intuito de indicar o(s) gene(s) de referência mais estável(is) a partir de um conjunto de genes candidatos ou genes sob um dado conjunto de condições experimentais (CHEN *et al.*, 2011).

### **3. OBJETIVO GERAL**

- ❖ Analisar o perfil de expressão por RT-qPCR dos principais genes relacionados com o metabolismo de lipídios em *J. curcas*.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Analisar a estabilidade de expressão dos genes de referência em diferentes estágios do desenvolvimento e germinação da semente de *J. curcas* através de RT-qPCR;
- ❖ Analisar os níveis de transcritos dos genes relacionados com a biossíntese e degradação de ácidos graxos e lipídios em diferentes estágios do desenvolvimento e germinação da semente de *J. curcas*;

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Análise de expressão gênica por RT-PCR e RT-qPCR**

#### **4.1.1. Material vegetal**

Sementes de *J. curcas* utilizadas para o estudo foram coletadas na Fazenda Experimental da UFC localizada no município de Pentecoste, Ceará, Brasil. Os tecidos selecionados para as análises foram: integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e endosperma de sementes em germinação. O integumento e o endosperma foram cuidadosamente isolados de sementes em desenvolvimento com o auxílio de espátulas. As sementes foram classificadas em nove estágios com base em características morfológicas, os quais foram denominados de estágios I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX (Quadro 1). Para as análises de expressão gênica do integumento interno foram utilizados os estágios I – IX e para as análises de expressão gênica no endosperma foram utilizados apenas os estágios V – IX (Figura 6), pois somente nesses estágios o endosperma encontrava-se celularizado e, dessa forma, passível de ser isolado. O material isolado foi armazenado a – 80°C.

Sementes foram colocadas para germinar em areia em casa de vegetação e os endospermas das mesmas foram coletados nos intervalos de 2, 4, 6, 7 e 8 dias após embebição - DAE (Figura 7) para utilização nas análises de expressão gênica. Endospermas de sementes maduras foram utilizados como tempo 0. O material coletado foi armazenado a – 80°C.

#### **4.1.2. Extração e purificação de RNA total**

O procedimento de extração de RNA foi realizado em bancada estéril livre de ribonucleases. Todo o material utilizado no procedimento foi autoclavado (a 121°C por 20 min) e colocado para secar em estufa a 80°C antes de serem usados.

Cerca de 300mg de tecido (integumento e endosperma) foram macerados em nitrogênio líquido. O macerado foi usado para extração de RNA total com o kit Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen), de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. No fim do processo, o RNA total foi suspenso em 50µL de água tratada com DEPC autoclavada. O kit de purificação RNeasy Plant Mini Kit® (Quiagen) foi utilizado para purificação do RNA total obtido, de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante.

Quadro 1. Caracterização morfológica dos estágios de sementes de *J. curcas* em desenvolvimento utilizados nas análises de expressão gênica.

<b>Estágios</b>	<b>Características morfológicas</b>
I	Sementes medindo 0,6 - 0,8 cm de comprimento com integumentos interno e externo amarelo claros
II	Sementes medindo 0,9 - 1,0 cm de comprimento com integumentos interno e externo amarelo claros
III	Sementes medindo 1,1 - 1,3 cm de comprimento com integumentos interno e externo amarelo claros
IV	Sementes medindo 1,4 - 1,6 cm de comprimento com integumentos interno e externo amarelo claros
V	Sementes medindo 1,7 - 1,9 cm de comprimento com integumentos interno e externo amarelo claros
VI	Sementes com integumento interno alaranjado apresentando extremidades bordôs e integumento externo amarelo claro
VII	Sementes com integumento interno apresentando uma área de 70 - 90% na cor bordô e integumento externo amarelo claro
VIII	Sementes com integumento interno preto e integumento externo amarelo claro
IX	Sementes com integumento interno preto e integumento externo amarelo claro com extremidades marrons







Figura 7. Sementes de pinhão manso em diferentes estágios de germinação. (A) – sementes maduras (0 dias); (B) - sementes com 2 DAE; (C) – sementes com 4 DAE; (D) – plântula com 6 DAE; (E) – plântula com 7 DAE; (F) – Plântula com 8 DAE. Barras equivalentes a 0,5cm.

#### **4.1.3. Quantificação e análise da integridade do RNA total**

A concentração e a qualidade dos RNAs foram determinadas antes e após o processo de purificação. A determinação da concentração e pureza das amostras de RNA foram monitoradas por intermédio de um espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) em leituras a 260nm. Absorbâncias de 260/280nm e 260/230nm foram utilizadas para verificar a qualidade do RNA quanto à contaminação por proteínas e ou carboidratos respectivamente. A integridade do RNA total foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio (0,5µg/µL), na qual se aplicou 0,5µg de RNA para corrida eletroforética. O RNA total foi visualizado em transluminador de luz UV e fotodocumentado por meio do Sistema Mini BIS Pro (Bio-Imaging Systems), apresentado em anexos.

#### **4.1.4. Síntese de DNA complementar (cDNA)**

Para a síntese do DNA complementar foram utilizados 2µg do RNA total purificado. Em cada reação foram adicionados 1µl de Oligo dT<sub>12-18</sub> (0,5µg/µL) (Invitrogen), 1µl de dNTP 10mM (Quiagen), 2,4µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM (Invitrogen), 4µl de tampão de reação 5X (ImProm-II<sup>TM</sup> Reaction Buffer, Promega) e água Milli-Q autoclavada. As amostras foram mantidas a 65°C por um período de 5 minutos para ocorrer à desnaturação e rapidamente transferido para banho em gelo. Em seguida, 1µL de transcriptase reversa Improm-II<sup>TM</sup> (Promega) foi adicionado a cada amostra, completando-se o volume da reação para 20µL com água milliQ autoclavada. Todo o processo de síntese do DNA complementar foi realizado no termociclador Biocycler (Long Gene Scientific Instruments) onde a reação ocorreu a uma temperatura de 42°C por 1h, seguida de 75°C por 15 min. O cDNA produzido foi armazenado a -20°C.

#### **4.1.5. Síntese de iniciadores para análise de expressão gênica por RT-qPCR**

Os iniciadores específicos para genes de referência (Tabela 1) utilizados na normalização dos dados foram construídos a partir de sequências de nucleotídeos sintetizados pela Invitrogen, complementares aos genes depositados na biblioteca de cDNA de *J. curcas* disponíveis em: <http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>.

Genes relacionados com o metabolismo de lipídios foram selecionados para a análise da expressão gênica em integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de *J. curcas* (Tabela 2). Os iniciadores específicos

**Tabela 1.** Genes de referência utilizados nos estudos de normalização por RT-qPCR de *J. curcas*, sequência dos iniciadores e tamanho do produto amplificado.

Gene	Produto gênico	Nº de acesso	Sequência dos iniciadores (5' – 3')	Amplicom (pb)
ACT11	<b>ACTINA 11</b>	JGCCJG2058B09.b	CTAAAGGCTAATGGGGAAAC/ CAACCACTTGATTAGAAGCC	68
Ta2	<b>ALFA TUBULINA 2</b>	Contig452	TTCAGTGTCTATCCATCTCC/ ATGAGGAAATCACCTGAGAG	207
EF1- $\alpha$	<b>FATOR DE ELONGAÇÃO 1-<math>\alpha</math></b>	Contig474	TGCTGTGCTCATTATTGAC/ GCATCCATCTTGTTGCAG	137
PP2A2	<b>FOSFATASE 2A -2</b>	Contig1139	AATATGGAAATGCCAACGTC/ GTAAGCAGAAGACCTGACTC	92
PUB3	<b>POLIUBIQUITINA 3</b>	Contig128	GATAGAAGTCCTCAGAAAGCA/ CAATAGTGTCTGAGCTTTC	107
GAPDH	<b>GLICERALDEÍDO- 3 FOSFATO DESIDROGENASE</b>	Contig 804	TGGTTGATCTCACTGTTAGG/ AGACTCCTCTTTGATAGCAG	73
CICLOF	<b>CICLOFILINA</b>	BABX01061345.1	AGATTAAACCTCCTGATAATGTCC/ GATTATTTTCAGCCGATGTAACAG	119
UCP	<b>PROTEÍNA DE CONJUGAÇÃO UBIQUITINA</b>	BABX01067133.1	CACCCAAATATTAACAGCAACGG/ TGAAAGCAACACCTTAGATATGG	92
T $\beta$	<b><math>\beta</math>-TUBULINA</b>	BABX01023750.1	AGGTATACAAGATTTGTCAGTCTC/ GTGAGCATCATTCTGTCAGG	105

**Tabela 2.** Genes do metabolismo de lipídios utilizados nas análises de expressão por RT-qPCR de *J. curcas*, sequência dos iniciadores e tamanho do produto amplificado.

Gene	Produto gênico	Nº de acesso	Sequência dos iniciadores (5' – 3')	Amplicom (pb)
ACC	Acetil-CoA carboxilase carboxiltransferase (biotina carboxilase)	JGCCJG2021E04.b	ACAGCATACTTGCCATCTGG/ GGAGGAACACATAATCAGG	73
BCCP	Acetil-CoA carboxilase carboxiltransferase (carreador de biotina)	Contig 655	TCAAGAGATATTGTGGAGTTGC/ GTGATTGGGAAGGTGAATGC	126
CAC	Acetil-CoA carboxilase carboxiltransferase (subunidade alfa)	GQ845013.1	GTCATTCTGAGCCATTAGGT/ CTCCTCTGTATCCATCTTTGTC	113
KAS I	$\beta$ -cetoacil sintase I	Contig 644	CGAGGTGAAGCAGATATAATGG/ ACCATCTTGATCTTTGTCCC	149
KAS II	$\beta$ -cetoacil sintase II	Contig 1291	GCATATCACATGACTGAACCA/ TGTAGTTCACATCCTCCCTG	102
KAS III	$\beta$ -cetoacil sintase III	DQ987701.1	TTCGAAATGTACTGGTAATCGG/ CAAATGTCTCTGGCCATCAC	181
EAR	enoil-ACP redutase	Contig 200	ATCCTATTAGGCGGGTTTCC/ GCGTAGAAGATAGGCAAGGA	132
KAR	$\beta$ -cetoacil-ACP redutase	Contig 635	CAAAGAGATTCAGGCTTATGG/ ACAATGTATCTCGTGTGATTCC	154
FATA	acil ACP tioesterase A	Contig 196	TTATATCGGATGGTTCTAGAG/ TGAAGATCTAAACCAGCACC	158
FATB	acil ACP tioesterase B	GJCCJC2044C02.B	CATTTACAAGAAACAGCCCT/ CTACTTCAACAACATCACCC	162
DGAT	diacilglicerol aciltransferase	GJCCJC2048D07.B1	GTTACCAGCCAAGTTATCCT/ AGGGATGTTGTGAATTCTGG	146
OLEO	oleosina 3	Contig 13	CATGTAACAGGTCAACAGAC/ AGAAATACACCAGACAAGCA	140
TAGL I	triacilglicerol lipase I	Contig 1070	GAAACACATTTGGGAAATCG/ GTATTCAATCCAGCAGTCGT	146
TAGL II	triacilglicerol lipase II	Contig 1303	ATAGCATTGGCATCTTTTCT/ ATAGTGAGTGACCTCCACCA	147
LACS	acil-CoA sintetase de cadeia longa	Contig 1208	TGACGGAGGCATCTCATTTG/ CATACTTCTCCACTAACGCC	150
ECH	enoil-CoA hidratase	Contig 482	CCTTTATCGGATTGATAGGG/ TCTTGCAATTAGTGGGATGAG	164
KAT	$\beta$ -cetoacil-CoA tiolase	Contig 102	ATTGCCGTAAGAAGTTGGAGC/ TCCATTCTGTGCTATGC	184
ACX 1	acil-CoA oxidase 1	Contig 1167	TCTTTCTGAAGAAGAGGCAGG/ GCCACCATTTGCTAGAAGTC	286
DECR	dienoil-CoA redutase	Contig 1191	TCATTTCTTCTCGCAAGCAG/ AGATTCTTCTTTGTTGTGC	117
ACAT	acetil-CoA acetiltransferase	GJCCJC2008B09.b	TTTCTCGGCAATGTTCTCAG/ GATGCCTAACTGAATACTCTGTG	165

para os genes alvos foram construídos a partir de sequências homólogas identificadas no banco de dados do genoma de *J. curcas*, disponíveis em: <http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>.

Todos os iniciadores foram desenhados nas junções éxon-éxon, com o intuito de evitar possíveis contaminações com DNA genômico, utilizando o programa Perl Primer v.1.1.20 (Marshall, 2004), aplicando os seguintes parâmetros: temperaturas de fusão (T<sub>m</sub>) de 58-60 °C, tamanho dos iniciadores entre 20 e 24pb e comprimento dos amplicons entre 50 e 250pb. Todos os iniciadores foram testados via RT-PCR com os fragmentos sendo visualizados em gel de agarose a 2%.

#### **4.1.6. RT-PCR**

A RT-PCR foi realizada utilizando os seguintes parâmetros: em cada reação foram adicionados 1µL de cDNA (~800ng), 1µl de dNTP 5mM, 0,75µl de cada oligonucleotídeo iniciador 20µM (senso e anti-senso), 0,125µl de enzima Go Taq® DNA Polymerase 5U (Promega), 5µl de tampão de reação 5X (Go Taq® 5X Green Buffer, Promega) e água Milli-Q livre de RNAses, perfazendo um total de 25µL por reação. As amplificações foram realizadas em termociclador Biocycler, aplicando um programa com etapa inicial de pré-desnaturação executado a 92°C por 5 minutos, seguido de 25 a 28 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 25 seg a 72°C. Por fim foi realizado um ciclo adicional de extensão de 5 minutos a 72°C. Uma alíquota de 5µL dos produtos de PCR de cada gene foi visualizada e analisada através de eletroforese em gel de agarose a 2%, previamente corado com brometo de etídio (0,5µg/µL).

#### **4.1.7. RT-qPCR**

Em cada reação de RT-qPCR foram utilizados 0,4µL de cada iniciador (400 nmoles), 1µl de cDNA (100 ng), 10µl de Power 1X SYBR® Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*) e 8,2µl de água livre de RNAses perfazendo um total de 20µl por reação. As reações foram realizadas utilizando o termociclador *Mastercycler® ep realplex* da *Eppendorf*, em uma placa de 96 poços. Cada reação foi feita em triplicatas, obedecendo aos seguintes parâmetros: 95°C por 15 minutos para ativação da enzima no 1º ciclo; 95°C por 15 segundos para desnaturação da fita; 15 segundos de anelamento a 50-60°C e extensão a 60°C por 20 segundos, no total de 40 ciclos.

#### 4.1.8. Análises dos dados

Os níveis de expressão dos genes de referência foram analisados usando a ferramenta geNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002) inserida no programa qbase<sup>PLUS</sup> 2.2 do Biogazelle disponível em <http://www.biogazelle.com/>. O geNorm é uma aplicação que calcula automaticamente uma medida de estabilidade de expressão (valor M) para cada gene de referência em um dado grupo de amostras com variação emparelhada (valor V) de um gene específico com todos os genes controle, além de indicar o número mínimo de genes necessários para uma normalização acurada dos dados. Os Cts (Cycle threshold) obtidos para os genes de referência e genes alvos no programa *realplex* foram utilizados no programa qbase<sup>PLUS</sup> 2.2 do Biogazelle para análise de expressão relativa dos genes usando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  de Livak, *et al.*, (2001).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estabilidade de expressão dos genes de referência em sementes de *J. curcas* avaliados por RT- qPCR

Os genes de referência utilizados para a análise de estabilidade da expressão gênica foram: actina-11 (ACT11), poliubiquitina 3 (PUB3), gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH), alfa tubulina 2 ( $T\alpha 2$ ), fator de alongação 1- $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ), fosfatase 2A-2 (PP2A2), ciclofilina (CICLOF), proteína de conjugação ubiquitina (UCP) e  $\beta$ -tubulina ( $T\beta$ ). Os genes foram submetidos à análise por RT-qPCR em um grupo de vinte estágios divididos em duas condições experimentais compreendendo desenvolvimento da semente com 14 estágios (9 estágios para o integumento e 5 estágios para o endosperma) e germinação da semente com 6 estágios (maduro, 2d, 4d, 6d, 7d e 8 dias após embebição).

O programa geNorm foi utilizado para determinar a estabilidade (valor  $M$ ) de expressão dos genes de referência nas condições analisadas. Este programa determina quais são os genes mais estáveis em um conjunto de genes utilizados para uma dada amostra de cDNA nas condições testadas. As análises no geNorm foram feitas em separado para cada condição experimental. No desenvolvimento da semente os genes de referência GAPDH, UCP, ACT11, PP2A2, CICLOF, PUB3 e  $T\beta$  apresentaram valores  $M$  abaixo do limite de corte ( $<1,5$ ). O limite de corte é uma margem indicada pelo geNorm onde genes com valores superiores a este limite são considerados instáveis e inferiores a este limite são considerados estáveis. Na germinação da semente os genes de referência EF1- $\alpha$ , PP2A2, GAPDH, PUB3, ACT11,  $T\beta$  e  $T\alpha 2$  ficaram com valores  $M$  abaixo do limite de corte.

De acordo com o programa utilizado, os genes GAPDH, UCP, ACT11, PP2A2 e CICLOF foram considerados os mais estáveis, para as amostras referentes ao desenvolvimento da semente, enquanto que os genes PUB3,  $T\beta$ ,  $T\alpha 2$  e EF1- $\alpha$  foram os que apresentaram menor estabilidade, com  $T\alpha 2$  e EF1- $\alpha$  obtendo valores acima do limite de corte (Figura 8).

Na germinação os genes considerados mais estáveis foram EF1- $\alpha$ , PP2A2, GAPDH, PUB3 e ACT11 enquanto que os menos estáveis foram  $T\beta$ ,  $T\alpha 2$ , UCP e CICLOF (Figura 9).



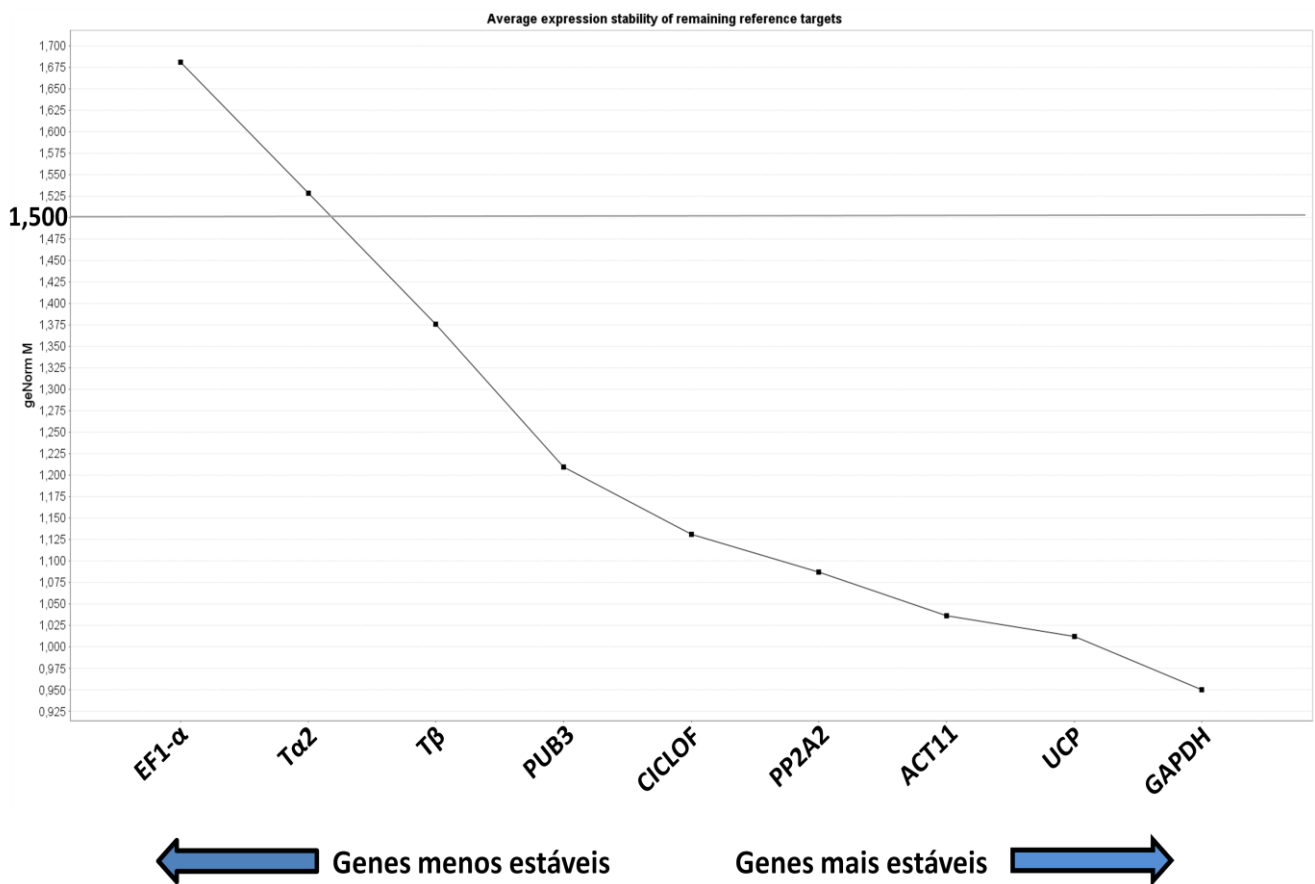


Figura 8. Classificação obtida pelos candidatos a genes de referência, com valores M fornecidos pelo geNorm referente aos estágios do desenvolvimento da semente de *J. curcas*. O gráfico mostra os genes mais estáveis em ordem crescente: EF1- $\alpha$ , T $\alpha$ 2, T $\beta$ , PUB3, CICLOF, PP2A2, ACT11, UCP e GAPDH.

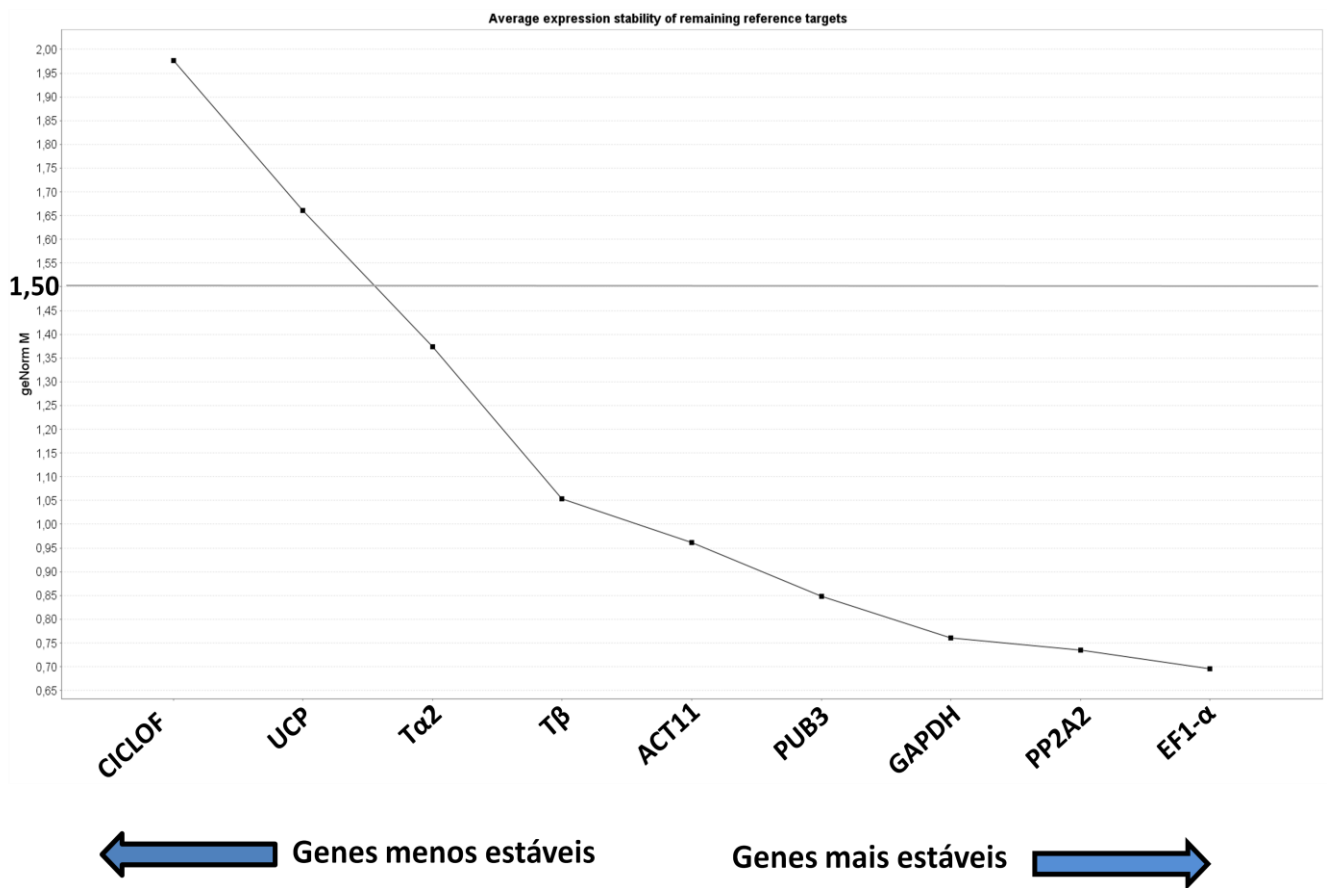


Figura 9. Classificação obtida pelos candidatos a genes de referência, com valores M fornecidos pelo geNorm referente aos estágios de germinação da semente de *J. curcas*. O gráfico mostra os genes mais estáveis em ordem crescente: CICLOF, UCP, T $\alpha$ 2, T $\beta$ , ACT11, PUB3, GAPDH, PP2A2, EF1- $\alpha$ .

O programa geNorm também avalia o número mínimo de genes a serem utilizados como referência para normalização dos dados de expressão gênica, tendo como parâmetro os valores de variação “V”. O geNorm “V” é obtido pela análise da variação da expressão dos genes dois a dois, indicando a quantidade ideal de genes a serem utilizados na normalização dos dados. A análise dos dados referentes ao desenvolvimento da semente (Figura 10), forneceram um valor para o geNorm “V” oscilando entre 0,20 e 0,33 ficando acima do valor de corte (0,15) estabelecido pela literatura (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). No entanto, segundo Manual do geNorm (2008) o valor de corte 0,15 proposto não deve ser seguido com rigor, pois o geNorm V apenas orienta na determinação do número ideal de genes de referência a serem utilizados, ou seja, o resultado acima de 0,15 não invalida os dados obtidos. Os resultados da análise feita pelo geNorm "V" mostraram que a utilização de cinco genes de referência (GAPDH, UCP, ACT11, PP2A2 e CICLOF) para a normalização dos dados do desenvolvimento da semente seria o mais indicado, pois ao se retirar ou incorporar novos genes à análise o valor do geNorm "V" aumentava. Diante do exposto, foram utilizados os cinco genes citados para normalizar os dados de RT-qPCR para o desenvolvimento da semente.

O geNorm "V" também foi utilizado para fazer a análise dos dados obtidos na germinação da semente (Figura 11). Os valores oscilaram entre 0,18 e 0,32 ficando também acima do valor de corte (0,15). De acordo com a análise feita pelo geNorm "V", foram utilizados cinco genes de referência (EF1- $\alpha$ , PP2A2, GAPDH, PUB3, ACT11) na normalização dos dados de RT-qPCR obtidos para a germinação.

Cunha (2011) realizou experimentos para avaliar o perfil de expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios em vários tecidos de *J. curcas*. A autora utilizou seis genes de referência (ACT11, T $\alpha$ 2, EF1- $\alpha$ , PP2A2, GAPDH, PUB3) para análise de estabilidade de expressão dos mesmos utilizando o programa geNorm. Seus resultados mostraram que os genes GAPDH e PP2A2 estavam entre os mais estáveis. Rocha (2012) avaliou o perfil de expressão de genes relacionados ao processo de morte celular programada no integumento e endosperma em desenvolvimento e endosperma em germinação da semente de *J. curcas*. O mesmo autor utilizou seis genes de referência no processo de seleção para escolha dos genes mais estáveis para utilizá-los na normalização de seus dados, tendo os genes GAPDH e PP2A2 dentre os mais estáveis. Estes dados estão em acordo com os obtidos neste trabalho, confirmando que

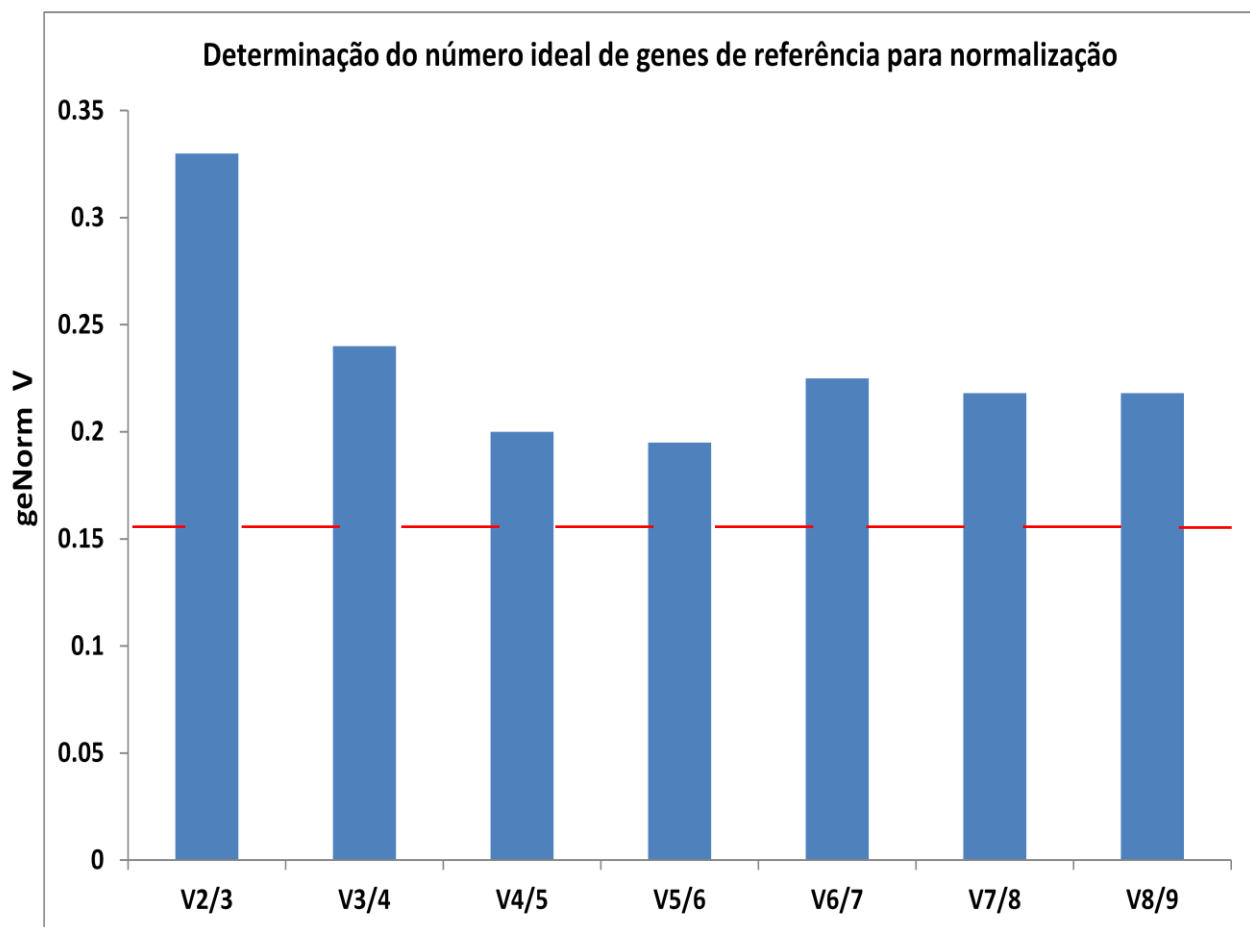


Figura 10. Determinação do número ideal de genes de referência para normalização. Gráfico dos valores V fornecido pelo geNorm para os nove candidatos à genes de referência para sementes em desenvolvimento de *J. curcas*.

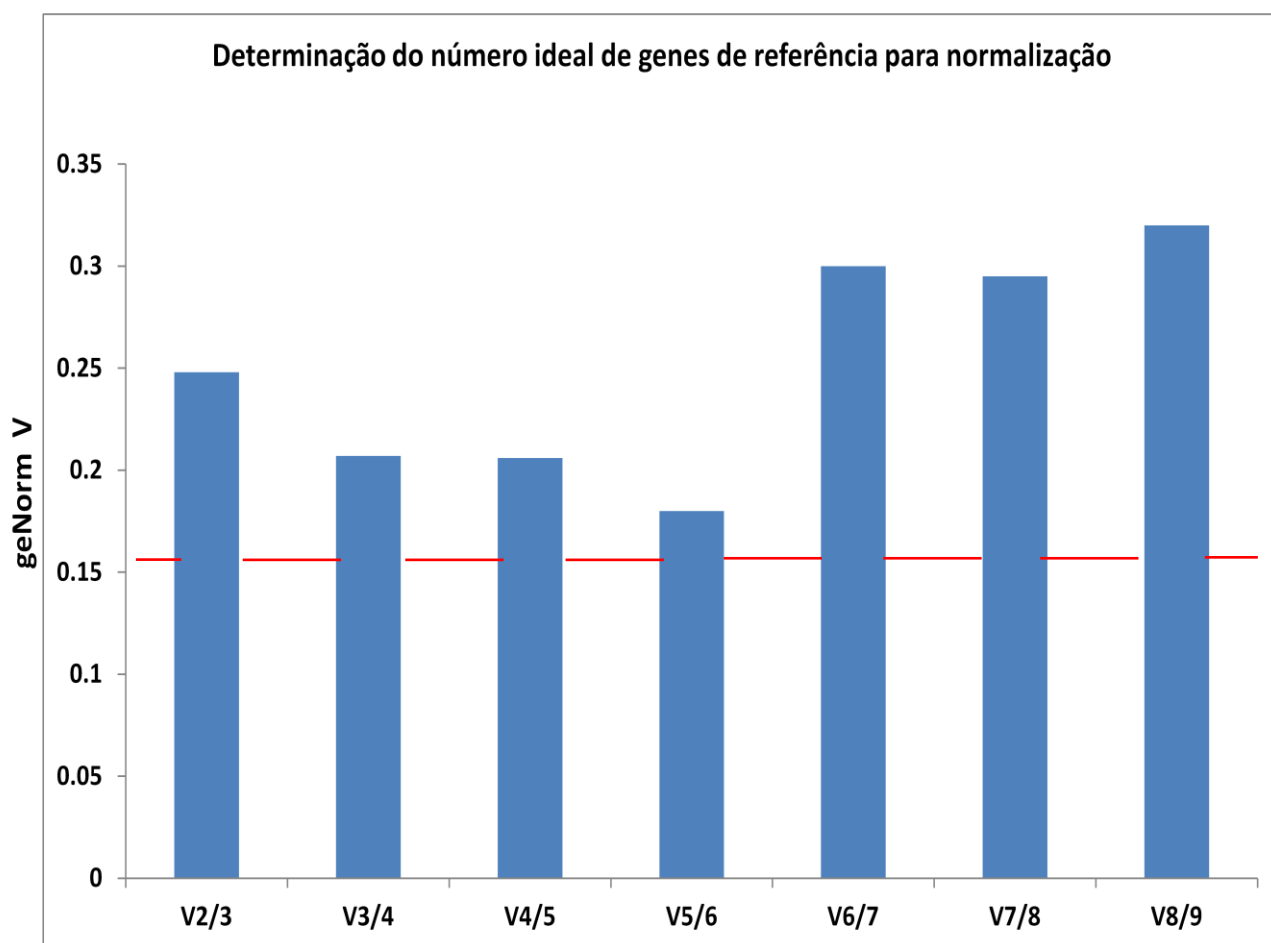


Figura 11. Determinação do número ideal de genes de referência para normalização. Gráfico dos valores V fornecido pelo geNorm para os nove candidatos à genes de referência para sementes em germinação de *J. curcas*.

os genes GAPDH e PP2A2 podem ser utilizados como genes normalizadores de dados no nível de expressão com genes de interesse para sementes em desenvolvimento e germinação de *J. curcas*.

A normalização com o uso de vários genes de referência tem se tornado uma prática padrão, visto que a utilização de um único gene endógeno pode levar a erros de normalização (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). No entanto os melhores genes de referência para os estudos de expressão de genes de um organismo podem depender dos tratamentos aplicados ou dos órgãos e tecidos estudados (REMANS *et al.*, 2008).

### **5.1.1 Validação dos genes de referência para RT-qPCR**

A técnica de RT-qPCR é um método amplamente utilizado em comparação com os métodos de expressão de genes convencionais, dado a sua alta sensibilidade, especificidade e dinâmica na quantificação (LI *et al.*, 2012). No entanto, para que os resultados de expressão do gene em estudo sejam precisos a RT-qPCR baseia-se na escolha de genes de referência estáveis para a normalização dos dados (BRUNNER *et al.*, 2004). A utilização de genes de referência inapropriados tem um impacto significativo sobre os resultados obtidos por RT-qPCR, podendo levar a conclusões erradas sobre a expressão do gene (GUTIERREZ *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2009).

Para verificar se os genes de referência utilizados neste trabalho foram apropriados, o padrão de expressão do gene Oleosina 3 (OLEO 3) foi avaliado com o intuito de validar os dados obtidos. As oleosinas aparecem como as proteínas mais abundantes associadas aos oleossomos, onde desempenham a função de prevenção da coalescência do oleossomo durante dissecação da semente além de atuar como sítio de ligação para lipases durante a germinação das sementes (PARTHIBANE *et al.*, 2012). Como esperado, o gene OLEO 3 (Figura 12 ) foi altamente expresso no endosperma de sementes em desenvolvimento. O gene OLEO 3 também apresentou alta expressão nos últimos estágios do integumento em desenvolvimento, enquanto que na germinação a expressão foi quase nula. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios relacionados com a distribuição espacial e temporal do gene oleosina em sementes (GU *et al.*, 2012; POPLUECHAI *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2007).

Os dados obtidos neste trabalho também estão em acordo com Cunha, (2011) e Rocha, (2012). Os referidos autores utilizaram o gene OLEO 3 para validar os dados

obtidos em seus experimentos, observando que o gene OLEO 3 apresentou altos níveis de expressão nas amostras relativas ao endosperma em desenvolvimento, e assim confirmando que os genes de referência utilizados neste trabalho são apropriados para a normalização dos dados obtidos neste trabalho.

## **5.2 Análise da expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios em sementes de *J. curcas***

Este tópico é iniciado com o gene oleosina (OLEO 3) utilizado na validação dos dados seguido dos genes relacionados com a biossíntese de ácidos graxos e triacilgliceróis no caso acetil-CoA carboxilase acetiltransferase (ACCase),  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase (KAS),  $\beta$ -cetoacil-ACP redutase (KAR), enoil-ACP redutase (EAR), acil-ACP tioesterases (Fat), diacilglicerol aciltransferase (DGAT). A análise segue com os genes triacilglicerol lipase (TAGL), acil-CoA sintetase de cadeia longa (LACS), acil-CoA oxidase (ACX 1), enoil-CoA hidratase (ECH),  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolase (KAT) e Dienoil-CoA redutase (DECR) todos relacionados à degradação de ácidos graxos e por fim o gene acetil-CoA acetiltransferase (ACAT) gene relacionado a várias vias metabólicas dentre elas a via do mevalonato.

### **❖ Oleosina (OLEO 3)**

Os resultados obtidos pela análise nos níveis de transcritos do gene OLEO 3 (Figura 12) mostram que o mesmo não teve expressão relativa detectada nos estágios referentes à germinação da semente. No desenvolvimento da semente o OLEO 3 foi altamente expresso. No integumento foi registrado expressão relativa a partir do 6º estágio ( $1070,000 \pm 110,121$ ), alcançando maior expressão no 7º estágio ( $30180,000 \pm 2,412$ ). No endosperma o pico de expressão foi alcançado no 9º estágio ( $99730,000 \pm 5,297$ ).

Em plantas oleaginosas, o óleo produzido na semente é armazenado em organelas subcelulares denominados corpos de óleo ou oleossomos (POPLUECHAI *et al.*, 2011; PARTHIBANE *et al.*, 2012). Os oleossomos são pequenas estruturas esféricas que possuem um núcleo formado por triacilgliceróis envolvidos por uma monocamada fosfolipídica, que por sua vez é encapsulada por proteínas. As oleosinas aparecem como as proteínas mais abundantes associadas aos oleossomos, onde desempenham a função de prevenção da coalescência do oleossomo durante dissecação da semente além de atuar como sítio de ligação para lipases durante a germinação das sementes

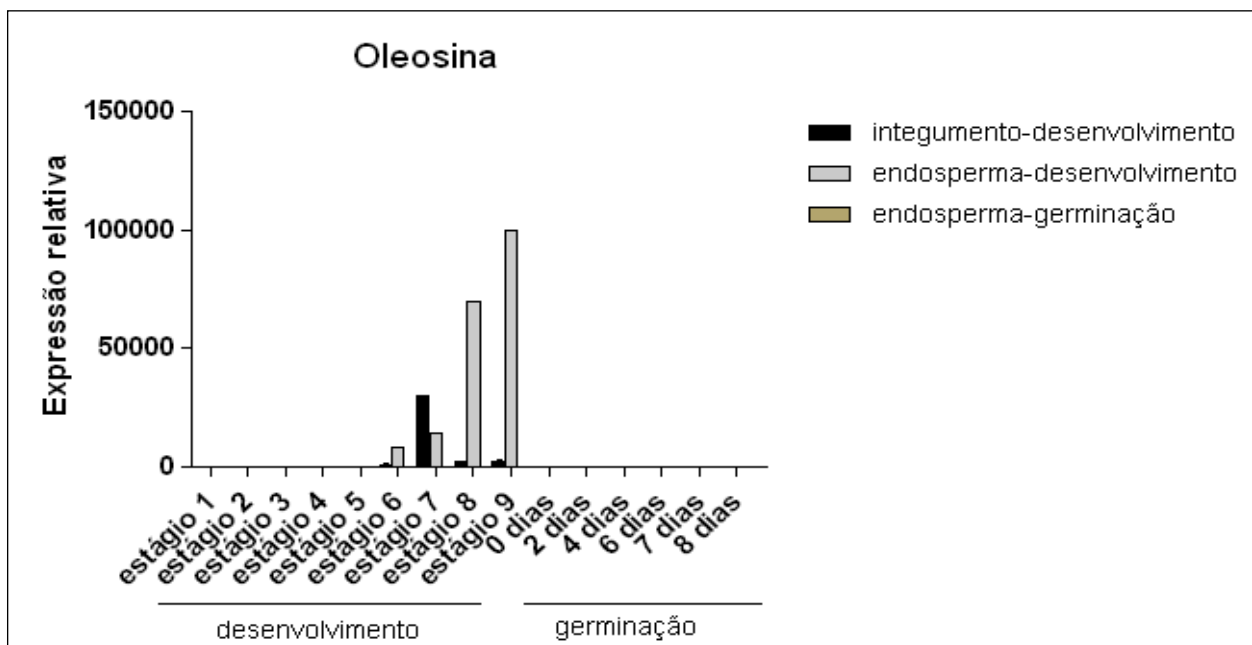


Figura 12. Padrão de expressão relativa do gene Oleosina (OLEO 3) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de *J. curcas*. Os valores do gráfico indicam a média de expressão das replicatas em relação ao calibrador (1º estágio para o desenvolvimento e 0 dias para a germinação).



(PARTHIBANE *et al.*, 2012). Outras proteínas como caleosinas, esteroleosinas e aquaporinas também compõe os oleossomos (BAUD; LEPINIEC, 2010).

Popluechai *et al.*, (2011) ao realizarem estudos proteômicos em corpos de óleo de sementes de *J. curcas* identificaram três oleosinas: OLEO 1, OLEO 2 e OLEO 3. Os mesmos autores relatam que a OLEO 3 apresentou maior nível de transcritos na semente em relação às outras isoformas. Chen *et al.*, (2007) observaram que as isoformas OLEO 1 e OLEO 2 são co-expressas durante o desenvolvimento da semente de *R. communis*, sugerindo que o pico de expressão destas isoformas seja resultado da demanda na síntese de novos oleossomos durante expansão celular do endosperma. Gu *et al.*, (2012) estudaram a expressão espacial e temporal de genes relacionados a biossíntese de ácidos graxos em *J. curcas*, onde identificaram que o gene oleosina é altamente expresso nos últimos estágios do desenvolvimento do endosperma, destacando sua importância para a formação dos oleossomos. Estes dados estão de acordo com os obtidos no presente trabalho, indicando que a alta expressão apresentada por OLEO 3 nos últimos estágios de desenvolvimento do endosperma esteja condicionada a formação dos oleossomos.

#### ❖ **Acetil-CoA carboxilase acetiltransferase (ACCase)**

Os genes da ACCase (Figura 13) avaliados foram: ACC, BCCP e CAC. Esses genes apresentaram diferenças significativas nos níveis de expressão relativa para as condições estudadas. No desenvolvimento da semente, os níveis de transcritos alcançados pelo gene ACC (figura 13A) para o integumento foram baixos com exceção para o 7º estágio ( $8,523 \pm 0,884$ ). No entanto, o mesmo teve um aumento na expressão relativa para os estágios do endosperma, atingindo o pico no 7º estágio ( $11,725 \pm 1,951$ ). Na germinação, os níveis de expressão foram maiores atingindo o máximo no 4º DAE ( $41,908 \pm 3,208$ ). O gene BCCP (figura 13B) foi pouco expresso durante o desenvolvimento da semente, obtendo uma expressão mínima para todos os estágios do integumento, sendo observado um pequeno aumento na expressão nos estágios do endosperma sendo o 9º estágio ( $4,065 \pm 0,609$ ) o estágio de maior expressão. No entanto nos estágios da germinação, com exceção para o 2º DAE ( $0,496 \pm 0,068$ ), o gene BCCP foi mais expresso que no desenvolvimento da semente registrando a maior expressão no 7º DAE ( $11,994 \pm 5,022$ ). Diferente dos dois outros genes citados, o gene

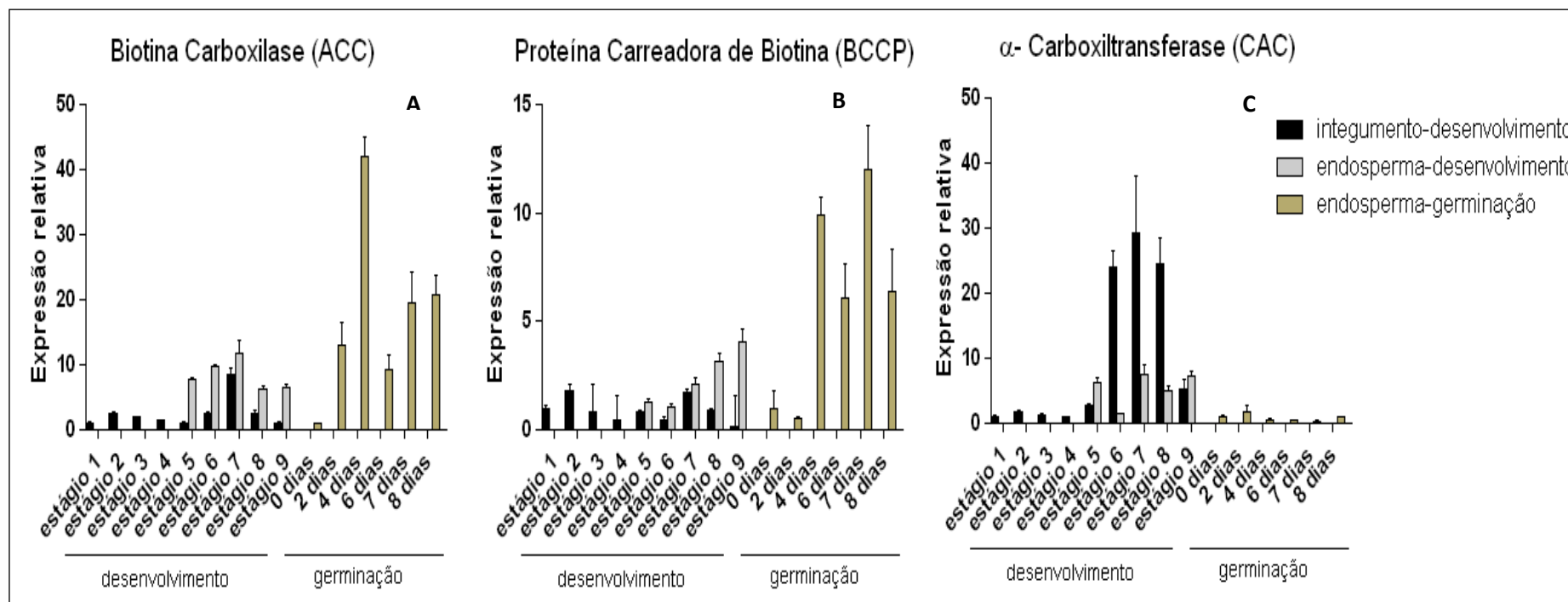


Figura 13. Padrões de expressão relativa das subunidades do gene ACCase (biotina carboxilase - A, proteína carreadora de biotina - B,  $\alpha$ -carboxiltransferase - C) obtidos por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma em desenvolvimento e germinação de *J. curcas*. Os valores do gráfico indicam a média de expressão das replicatas em relação ao calibrador (1º estágio para o desenvolvimento e 0 dias para a germinação).

CAC (figura 13C) obteve altos níveis de expressão para o desenvolvimento da semente, com os estágios do integumento apresentando maiores níveis de transcritos em comparação aos encontrados no endosperma, alcançando o pico de expressão no 7º estágio ( $29,373 \pm 8,737$ ). Em contraposição o gene CAC apresentou nível de transcritos quase nulos durante a germinação.

A acetil-CoA carboxilase (ACCase) catalisa a reação dependente de ATP entre acetil-CoA e bicarbonato para formar o malonil-CoA (KONISHI e SASAKI, 1994). A formação de malonil-CoA é um passo essencial para a biossíntese de ácidos graxos, o que eventualmente leva a biossíntese de lípidos de membrana de órgãos em desenvolvimento, tais como as folhas, e a biossíntese de lípidos de armazenamento em sementes (GU *et al.*, 2011). A ACCase possui duas formas distintas: a forma homodímera multifuncional, composta por um grande polipeptídeo com três domínios e a forma heterodímera com quatro subunidades – biotina carboxilase (ACC), proteína carreadora de biotina (BCCP) e as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da carboxiltransferase (CAC). A forma homodímera está presente no citosol localizada principalmente no retículo endoplasmático na maioria das plantas, enquanto que a heterodímera é encontrada nos plastídios de dicotiledôneas e monocotiledôneas com exceção das gramíneas (KONISHI *et al.*, 1996). Em *Arabidopsis thaliana*, três das subunidades que compõem a forma heterodímera são codificadas por genes nucleares e a quarta subunidade ( $\beta$ -carboxiltransferase) é codificada pelo genoma do cloroplasto (KE *et al.*, 2000). Segundo Baud *et al.*, (2003), em *A. thaliana* a ACCase possui duas atividades: uma plastidial em que catalisa a primeira etapa da biossíntese de ácidos graxos sendo a principal fornecedora de malonil-CoA; e uma outra atividade citosólica em que a produção de malonil-CoA está relacionada a biossíntese de metabólitos secundários, (por exemplo flavonóides) e para a elongação de ácidos graxos de cadeia longa, além de ser essencial para o desenvolvimento do embrião.

Gu *et al.*, (2011) observaram grandes diferenças no perfil de expressão temporal e espacial entre os genes que formam a ACCase no endosperma de sementes em desenvolvimento e folhas de *J. curcas*, sugerindo que essa diferença de expressão deva fazer parte de um sistema de regulação para controlar a atividade da ACCase nos dois órgãos na planta. Ao estudar a expressão de genes envolvidos com a síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis no endosperma em desenvolvimento da semente e folhas de *Ricinus communis* L., Chen *et al.*, (2007) também observaram diferenças no padrão de

expressão entre os genes da ACCase. Esses dados estão de acordo com os obtidos neste trabalho, no qual também foi observado diferenças no padrão de expressão das subunidades que compõe a ACCase o que sugere que essa diferença seja um ponto regulatório na atividade da ACCase em *J. curcas*.

#### ❖ **$\beta$ -cetoacil-ACP Sintase (KAS)**

O gene KAS III (Figura 14A) apresentou baixo nível de expressão nos estágios de desenvolvimento quando comparado com as outras isoformas, onde nos estágios de integumento a maior expressão foi obtida no 7º estágio ( $5,288 \pm 0,530$ ), enquanto que nos estágios do endosperma, o 9º estágio ( $4,142 \pm 0,641$ ) foi o mais expresso. Na germinação o gene KAS III não apresentou expressão relativa aparente. O gene KAS I (Figura 14B) no desenvolvimento da semente apresentou um padrão de expressão, em que os estágios do integumento foram pouco expressos, excetuando-se o 7º estágio ( $20,680 \pm 3,120$ ), enquanto que os estágios do endosperma foram altamente expressos com o pico de expressão sendo alcançado no 8º estágio ( $34,876 \pm 8,140$ ). Durante a germinação, o gene KAS I apresentou maior nível de expressão que o calibrador (0 dias) em todos os estágios analisados, sendo que o pico de expressão foi obtido no 8º DAE ( $47,500 \pm 7,178$ ). Com o gene KAS II (Figura 14C) os níveis de expressão relativa para o desenvolvimento foram altos tanto para os últimos estágios do integumento, com o 7º estágio ( $53,336 \pm 8,722$ ) sendo o mais expresso, como para os estágios do endosperma em que a maior expressão foi obtida no 8º estágio ( $73,935 \pm 8,711$ ). Na germinação o gene KAS II apresentou expressão quase nula.

As isoenzimas pertencentes a esta família são responsáveis pelas reações de condensação entre o malonil-ACP e Acil-ACP obtendo como produto o  $\beta$ -cetoacil-ACP. Nas plantas são encontradas três isoenzimas desta família, KAS I, II e III, caracterizadas pela especificidade de seus substratos. A KAS III utiliza o acetil-CoA como primer condensando-o com o malonil-ACP formando cadeias 4:0 – ACP (SCHUCH, 1994). A KAS I tem o papel de alongar a cadeia de 4:0-ACP até cadeias entre 12:0 e 16:0-ACP e a KAS II completa a síntese para 18:0-ACP (SHIMAKATA, 1982).

Li *et al.*, (2008) realizaram a clonagem do gene KAS III seguida de uma análise do perfil de expressão do mesmo em diferentes tecidos e desenvolvimento

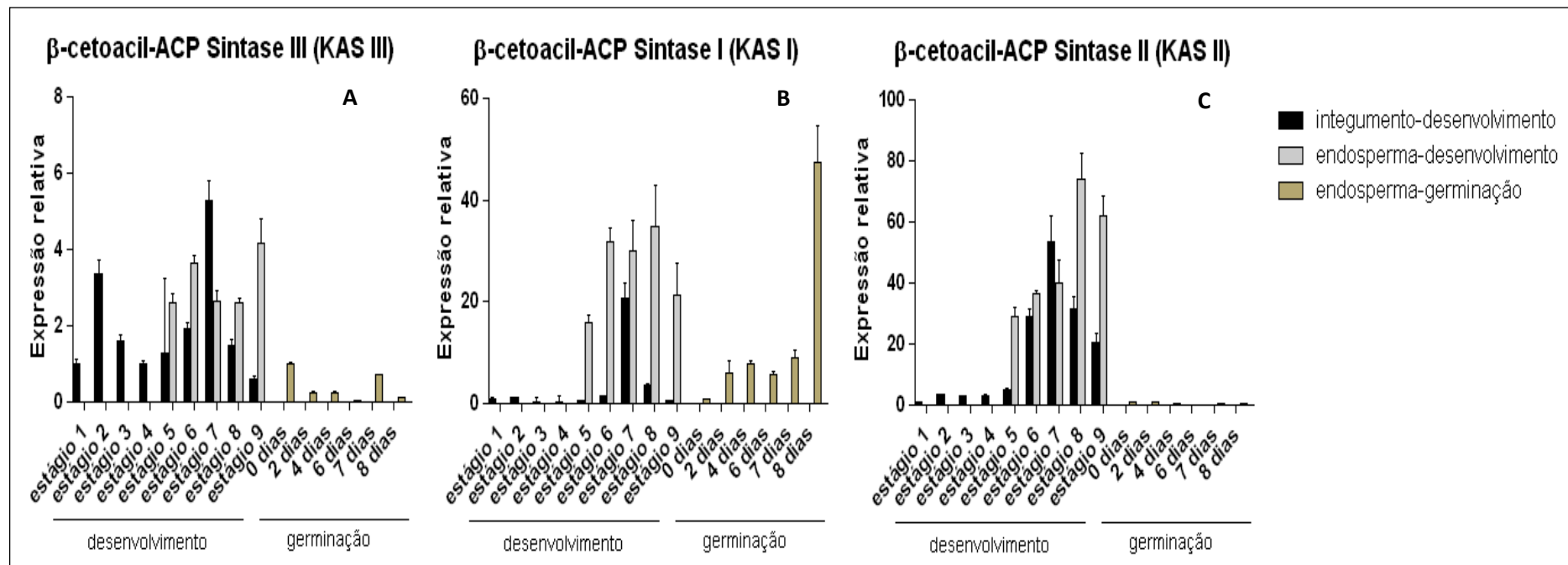


Figura 14. Padrões de expressão relativa dos genes KAS III (A), KAS I (B) e KAS II (C) obtidos por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de *J. curcas*. Os valores do gráfico indicam a média de expressão das replicatas em relação ao calibrador (1º estágio para o desenvolvimento e 0 dias para a germinação).

da semente de *J. curcas*, relatando que o gene KAS III era expresso em todos os tecidos examinados e que a mesma aumentou no desenvolvimento da semente. Wu e Xue (2010) demonstraram a importância da KAS I na síntese de ácidos graxos em *A. thaliana*, bem como seu papel na divisão do cloroplasto e desenvolvimento do embrião, onde observaram que o gene KAS I é expresso em vários tecidos e em diferentes estágios do desenvolvimento das folhas, sendo que o gene foi altamente expresso em alguns dos estágios estudados. Após clonagem do gene KAS II, Wei *et al.*, (2012) analisaram o padrão de expressão do mesmo em vários tecidos e diferentes estágios do desenvolvimento da semente de *J. curcas*, observando que o mesmo foi expresso em todos tecidos e estágios do desenvolvimento da semente analisados, destacando o aumento da expressão nos últimos estágios do desenvolvimento estudados. Gu *et al.*, (2012) investigaram a expressão espacial e temporal de genes relacionados a biossíntese de ácidos graxos no endosperma em desenvolvimento da semente de *J. curcas*, observando que as isoformas do gene KAS apresentaram níveis de expressão diferenciados em diferentes estágios do desenvolvimento. Estes dados estão em acordo com os obtidos neste trabalho onde foi observada uma diferença nos níveis de expressão de todas as isoformas da KAS estudadas. Os dados obtidos revelam ainda que as isoformas apresentaram um aumento da expressão no desenvolvimento da semente, confirmando a importância destas nas etapas de condensação na biossíntese de ácidos graxos. A alta expressão apresentada pela KAS II aponta para uma alta produção de ácidos graxos com 18C, que podem através da ação de desaturases formar os ácidos oleico e linoleico, os principais ácidos graxos constituintes do óleo de pinhão manso.

#### ❖ **$\beta$ -cetoacil-ACP redutase (KAR)**

A expressão relativa do gene KAR (Figura 15) para o desenvolvimento da semente foi baixa, tanto para as amostras do integumento como para o endosperma em desenvolvimento, diferente do que ocorreu no endosperma em germinação onde o mesmo obteve um padrão de expressão alto com o pico de expressão sendo alcançado no 2º DAE ( $37,500 \pm 8,813$ ).

A segunda etapa do ciclo de alongação na síntese de ácidos graxos é uma reação dependente de NADPH onde a enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP redutase (KAR) catalisa a redução de  $\beta$ -cetoacil-ACP para produzir o  $\beta$ -hidroxiacil-ACP (SILVA *et al.*, 2008). A enzima pertencente à família das redutases demonstra forte preferência por NADPH,

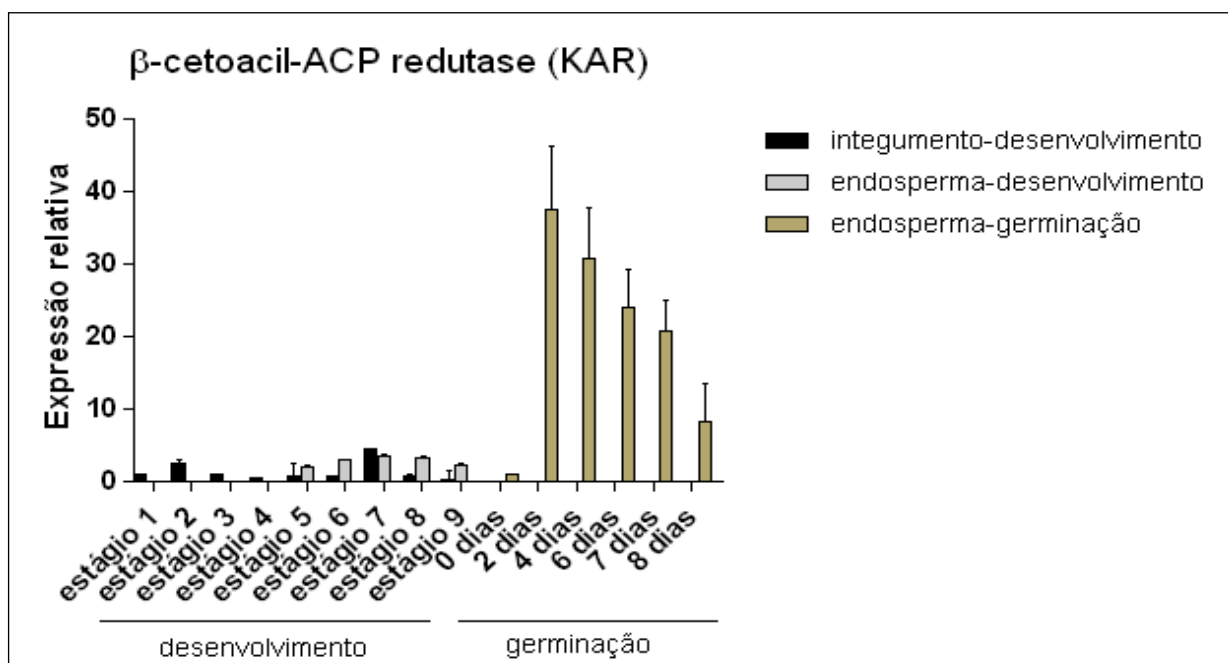


Figura 15. Padrão de expressão relativa do gene  $\beta$ -cetoacil-ACP redutase (KAR) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de *J. curcas*. Os valores do gráfico indicam a média de expressão das replicatas em relação ao calibrador (1º estágio para o desenvolvimento e 0 dias para a germinação).

tendo forte especificidade por  $\beta$ -cetoacil de cadeia longa.

O'Hara *et al.*, (2007) modificaram a expressão da KAR em *Brassica napus* e observaram mudanças na aparência normal das sementes bem como redução na quantidade de ácidos graxos detectáveis. Não obstante, O'Hara *et al.*, (2002) analisaram a expressão da KAR em tecidos foliares e embriões no qual observaram que o gene atingiu um alto nível de expressão entre 20 e 29 dias após a floração. Surpreendentemente neste trabalho o gene KAR teve seus níveis de expressão mais elevados nos estágios de germinação. A baixa expressão desse gene durante o desenvolvimento da semente parece não interferir no processo de biossíntese de ácidos graxos e consequente acúmulo de óleo.

#### ❖ **Enoil-ACP redutase (EAR)**

Os dados sobre a atividade transcricional obtidos para a EAR (Figura 16) mostram uma expressão relativa mais evidente nos estágios do endosperma em desenvolvimento, com a maior atividade sendo registrada no 7º estágio ( $17,448 \pm 1,718$ ). Nos estágios do integumento de sementes em desenvolvimento o gene EAR foi pouco expresso, fato que também ocorreu nos estágios do endosperma em germinação, com a maior expressão sendo alcançada no 4º DAE ( $5,607 \pm 1,146$ ).

A enoil-ACP redutase catalisa a reação dependente de NADPH, onde remove uma dupla ligação *trans*-insaturada produzindo acil-ACP saturado (POGHOSYAN *et al.*, 2005). Mou *et al.*, (2000) ao inserirem uma mutação no éxon que codifica a EAR em *A. thaliana* observaram decréscimo na atividade de EAR causando defeito no desenvolvimento nos grana do cloroplasto, morte celular prematura em células do mesófilo, bem como redução na fertilidade da planta. Ao estudarem a expressão transitória e temporal em oliva (*Olea europaea* L.), Poghosyan *et al.*, (2005) observaram altos níveis de transcritos do gene EAR em vários tecidos, incluindo embrião e endosperma de sementes em desenvolvimento. Fawcett *et al.*, (1994) estudaram padrões de expressão de isoformas de EAR em folhas e sementes em desenvolvimento de *Brassica napus*, identificando um aumento da expressão destas no desenvolvimento da semente. O perfil de expressão apresentado pelo gene EAR em *J. curcas* evidencia que o mesmo é importante para o processo de síntese de ácidos graxos no desenvolvimento da semente.



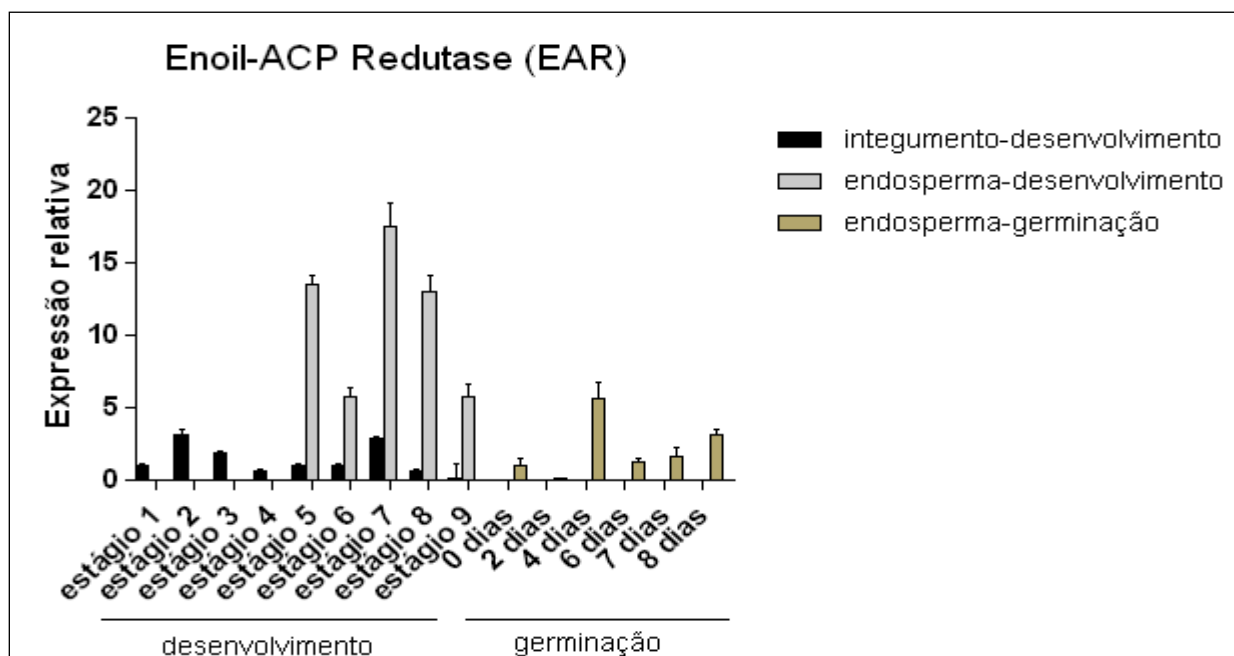


Figura 16. Padrão de expressão relativa do gene Enoil-ACP redutase (EAR) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de *J. curcas*. Os valores do gráfico indicam a média de expressão das replicatas em relação ao calibrador (1º estágio para o desenvolvimento e 0 dias para a germinação).

### ❖ Acil-ACP tioesterase (Fat)

As duas tioesterases (Figura 17) apresentaram expressões relativas diferentes no desenvolvimento da semente, com exceção para estágios do integumento que apresentaram expressão similares. No endosperma em desenvolvimento o gene *FatA* (Figura 17A) foi o mais expresso apresentando níveis de transcritos crescente a cada estágio, atingindo o pico de expressão no 9º estágio ( $20,178 \pm 1,101$ ), no entanto o gene *FatB* (Figura 17B) apresentou baixos níveis de expressão. Durante a germinação foi observado o inverso, uma vez que o gene *FatA* apresentou baixa expressão e o gene *FatB* foi bastante expresso nos dois últimos estágios, com o 8º DAE ( $16,502 \pm 6,237$ ) sendo o mais expresso.

Acil-ACP tioesterases (*Fat*) são enzimas que controlam o término da síntese de ácidos graxos no interior dos plastídios pela hidrólise do complexo acil-ACP (MORENO-PEREZ *et al.*, 2012). As *Fats* são codificadas por genes nucleares e então importadas para os plastídios, onde sofrem maturação. Essas enzimas são classificadas em duas famílias, *FatA* e *FatB* (JONES *et al.*, 1995), sendo que as *FatA* são enzimas com sequências altamente conservadas em diferentes espécies de plantas com especificidade para substratos 18:1-ACP (SÁNCHEZ-GARCÍA *et al.*, 2010). As tioesterases *FatB* são mais variáveis e podem ser classificadas em duas sub-famílias: *FatB1* e *FatB2*, com *FatB1* sendo específica para o palmitoil-ACP e oleoil-ACP, enquanto que *FatB2* possui alta atividade com substratos saturados C8-C14. As tioesterases são enzimas chave na determinação de quais ácidos graxos são exportados para o citosol e incorporados a glicerolipídios sintetizados no retículo endoplasmático incluindo os triacilgliceróis presentes em sementes oleaginosas (VOELKER, 1996). Segundo Moreno-Perez *et al.*, (2012), a diminuição da expressão da *FatA* em *A. thaliana* provocaria um pequeno decréscimo no acúmulo de lipídios e alterações na composição dos ácidos graxos das sementes além de causar uma regulação negativa de alguns genes relacionados com a síntese de ácidos graxos como a KAS II e estearoil-ACP dessaturase. Sánchez-García *et al.*, (2010) ao estudarem o perfil de expressão de *FatA* e *FatB*, observaram que ambos são expressos, embora com diferenças no padrão de expressão, em diferentes tecidos e estágios do desenvolvimento da semente de *R. communis*. Esses dados corroboram com os obtidos neste trabalho com *J. curcas* onde também foi observado a diferença de expressão entre as tioesterases *FatA*

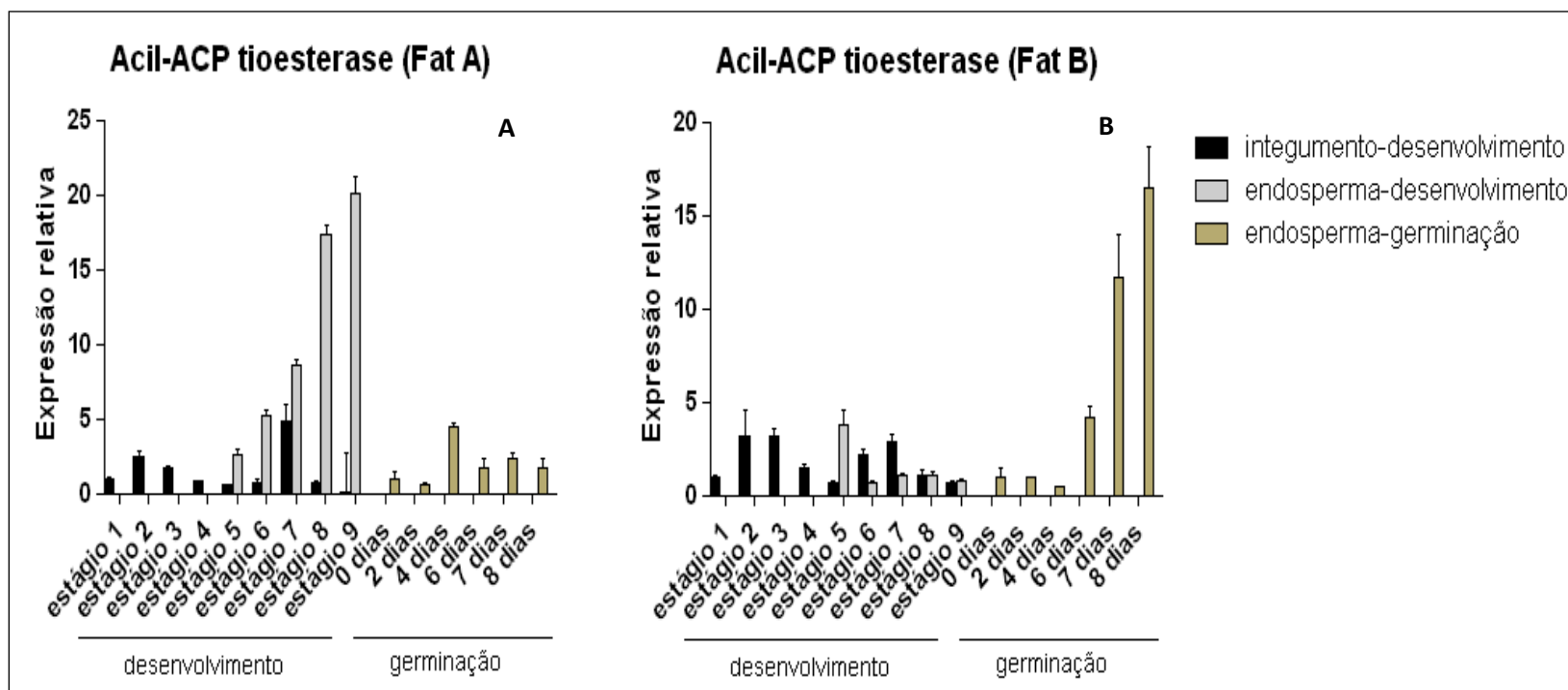


Figura 17. Padrões de expressão relativa dos genes FatA (A) e FatB (B) obtidos por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de *J. curcas*. Os valores do gráfico indicam a média de expressão das replicatas em relação ao calibrador (1° estágio para o desenvolvimento e 0 dias para a germinação).

e FatB analisadas. Segundo Jiang *et al.*, (2012) durante o desenvolvimento da semente de *J. curcas* a quantidade de ácidos graxos insaturados C18:1 aumenta enquanto que os saturados C16:0 e C18:0 diminui. Estes dados estão de acordo com os dados obtidos neste trabalho, onde a expressão de FatA, específica para substratos 18:1-ACP, aumentou e a de FatB diminuiu durante o desenvolvimento da semente.

#### ❖ Diacilglicerol aciltransferase (DGAT)

O nível de transcritos apresentados pelo gene DGAT (Figura 18), nodesenvolvimento da semente indicam que o gene foi altamente expresso durante os últimos estágios do integumento com o 6º estágio ( $58,787 \pm 7,268$ ) apresentando o maior nível de transcritos. O mesmo não ocorreu com o endosperma em desenvolvimento, onde os níveis de transcritos foram baixos, fato que também ocorreu com as amostras da germinação, com exceção para o 7º DAE ( $24,000 \pm 8,011$ ) que teve expressão significativa.

A DGAT é uma enzima presente na etapa final da síntese de triacilgliceróis, onde catalisa a acilação do sn-1,2-diacilglicerol na posição sn-3 usando como substrato acil-CoA (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2011). A DGAT é considerada uma enzima limitante na acumulação de lipídios de armazenamento em plantas (ICHIHARA *et al.*, 1988 ; PERRY e HARWOOD, 1993).

Lu *et al.*, (2003) observaram em plantas transgênicas de *A. thaliana*, que a expressão de DGAT não só ocorre em sementes em desenvolvimento mas também em plântulas com 7 dias de germinação, sugerindo que a síntese de triacilgliceróis também ocorra durante a germinação. Além disso, os mesmos autores sugerem que no caso de inibição da  $\beta$ -oxidação, os ácidos graxos liberados a partir de triacilgliceróis pela ação de lipases precisariam ser reciclados e a DGAT provavelmente catalisaria essa reação. He *et al.*, (2006) observaram a atividade da DGAT em cotilédones de sementes de mamona (*R. communis*) em germinação, no qual perceberam que o mesmo é expresso atingindo o pico no 7º dia após embebição, indicando a possibilidade de ocorrer síntese de triacilgliceróis nos cotilédones da semente. O padrão de expressão relativa obtido pelo gene DGAT neste trabalho com *J. curcas* sugere que possa ocorrer síntese de triacilgliceróis na germinação e que a alta expressão alcançada no integumento pode estar relacionado ao trabalho de reciclagem de ácidos graxos liberados pela ação de lipases.

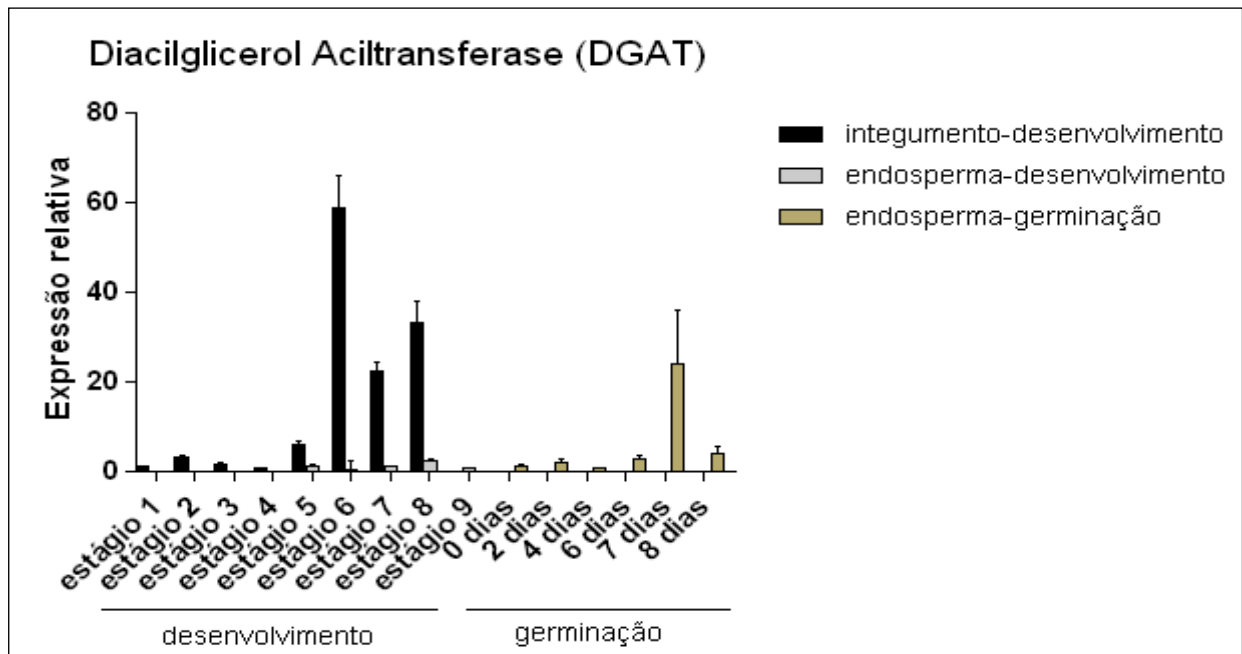


Figura 18. Padrão de expressão relativa do gene Diacilglicerol aciltransferase (DGAT) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de *J. curcas*. Os valores do gráfico indicam a média de expressão das replicatas em relação ao calibrador (1º estágio para o desenvolvimento e 0 dias para a germinação).

### ❖ **Triacilglicerol lipase (TAGL)**

As duas TAGLs (Figura 19) analisadas nesse trabalho apresentaram padrões de expressão distintos principalmente nos estágios da germinação. No desenvolvimento da semente as TAGLs foram mais expressas no integumento, onde a TAGL I (Figura 19A) apresentou o maior nível de expressão no 6º estágio ( $146,466 \pm 14,708$ ), coincidindo com a TAGL II (Figura 19B) que no mesmo 6º estágio ( $55,014 \pm 8,978$ ) apresentou seu maior nível de expressão. Enquanto que no endosperma as TAGLs foram pouco expressas, excetuando-se o 7º estágio ( $11,977 \pm 3,550$ ) da TAGL I e o 8º estágio ( $15,511 \pm 1,349$ ) da TAGL II. Na germinação a TAGL II foi altamente expressa alcançando a maior expressão no 7º DAE ( $357,129 \pm 47,632$ ), enquanto que TAGL I apresentou níveis de transcritos quase nulos.

A degradação de lípidios armazenados na forma de triacilgliceróis durante a germinação é um processo iniciado por lipases que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis liberando ácidos graxos livres e glicerol. A maioria das TAGLs em plantas tem sido encontradas ligadas a membranas de oleossomos, glioxissomos e frações microsossomais em extratos de sementes, dependendo da espécie (MUKHERJEE, 1994 & GRAHAM, 2008).

Eastmond, (2006) em seu trabalho com mutantes de *A. thaliana* sugeriu que a lipase SPD1 é responsável pelo primeiro ataque hidrolítico na molécula de triacilglicerol após a germinação da semente. Kelly *et al.*, (2011) investigaram lipases envolvidas na degradação de triacilgliceróis em mutantes de *A. Thaliana* observando quais consequências fisiológicas poderiam ocorrer para a germinação, estabelecimento e crescimento pós-germinativo da plântula, no caso de deficiência desse processo metabólico. Os mesmos autores relatam que a germinação da semente foi diminuída em mutantes SPD1 e SPD1L e que o crescimento pós-germinativo da plântula foi retardado. Costa *et al.*, (2010) analisaram o transcriptoma de sementes em desenvolvimento e germinação de *J. curcas*, onde identificaram um grande número de TAGLs durante a germinação da semente. Brown *et al.*, (2012) identificaram sete lipases em mamona (*R. communis*) relatando diferenças significativas na expressão destas na germinação e desenvolvimento da semente. Zong *et al.*, (2012) relataram o envolvimento de lipases no estágio final do processo de morte celular programada (MCP) em células de plantas. Estudos realizados em nosso laboratório indicam que o processo de MCP ocorre no

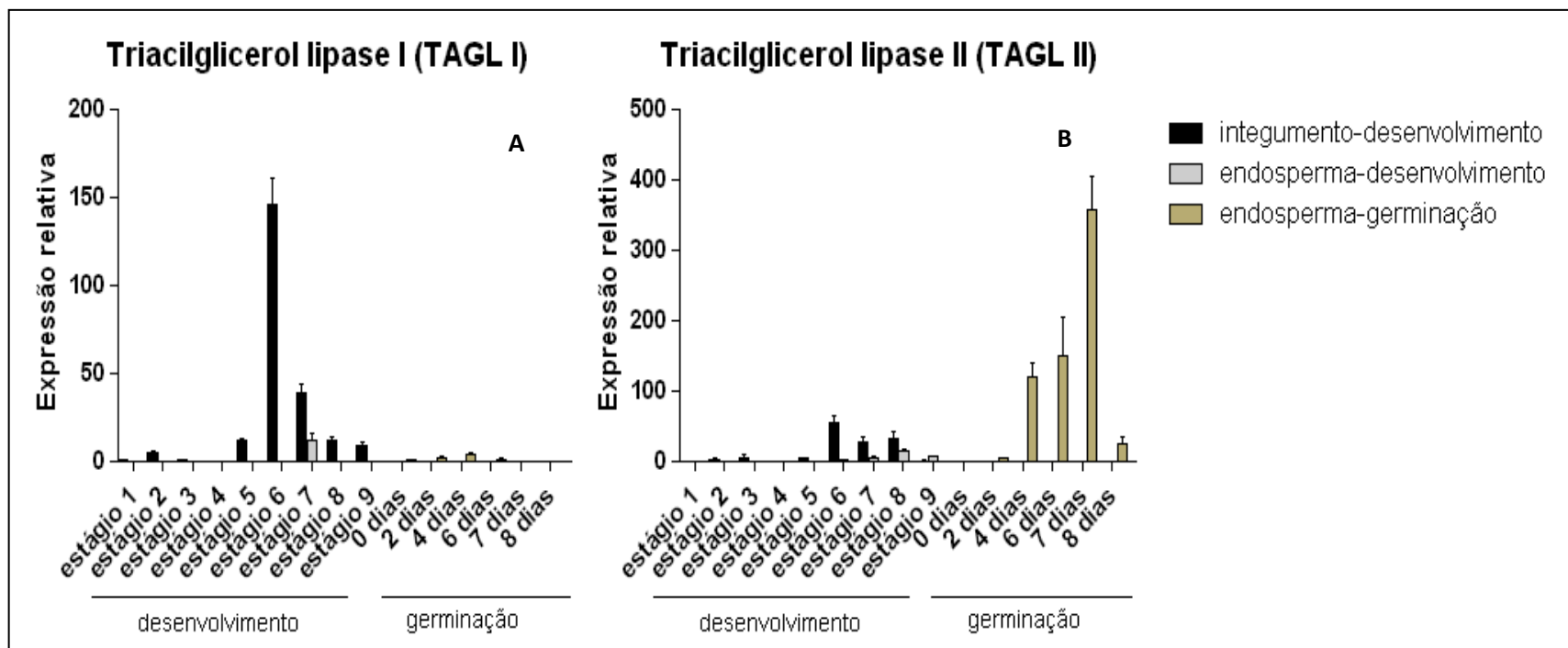


Figura 19. Padrões de expressão relativa dos genes TAGL I (A) e TAGL II (B) obtidos por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de *J. curcas*. Os valores do gráfico indicam a média de expressão das replicatas em relação ao calibrador (estágio 1 para o desenvolvimento e 0 dias para a germinação).

integumento de sementes em desenvolvimento de *J. curcas*. Esses dados estão em acordo com a alta expressão alcançada pela TAGL I nos estágios finais do integumento sugerindo que este gene possa estar relacionado à MCP. Já os altos níveis de expressão apresentados pelo gene TAGL II no endosperma em germinação sugere que este, possa estar envolvido no processo de degradação de triacilgliceróis armazenados nos oleossomos

#### ❖ **Acil-CoA sintetase de cadeia longa (LACS)**

A expressão relativa obtida pelo gene LACS (Figura 20), mostra que nos estágios do desenvolvimento da semente a expressão alcançada foi baixa, com o integumento tendo o 2º estágio ( $6,891 \pm 1,188$ ) como o mais expresso, enquanto que a expressão para o endosperma foram quase nulas. Na germinação o gene LACS foi mais expresso com o 7º DAE ( $18,992 \pm 5,142$ ) atingindo o maior nível de transcritos.

Para que ocorra a degradação de ácidos graxos pela  $\beta$ -oxidação, os mesmos precisam passar pelo processo de ativação. As Acil-CoA sintetases estão envolvidas diretamente nesse processo ativando ácidos graxos livres obtendo como produto da reação tioésteres de acil-CoA (FULDA *et al.*, 2002). As LACS têm papel fundamental na doação de grupos Acil ativados que atuam como substratos em várias vias metabólicas (SHOCKEY *et al.*, 2002). Segundo Schnurr *et al.*, (2004) as LACS são codificadas por uma família de pelo menos nove genes em *A. thaliana* com atuação na síntese de lipídios, catabolismo de ácidos graxos e transporte de ácidos graxos entre compartimentos sub-celulares.

Fulda *et al.*, (2002), identificaram duas isoenzimas de acil-CoA sintetases de cadeia longa em *A. thaliana*, LACS6 e LACS7, com alta expressão durante a germinação das sementes sugerindo que ambas estão envolvidas com a  $\beta$ -oxidação. Fulda *et al.*, (2004) investigaram o papel biológico e bioquímico dos genes LACS 6 e LACS 7, propondo que a atividade de ambos é importante para o desenvolvimento da plântula e conseqüentemente essencial para o catabolismo dos ácidos graxos. Esses dados estão de acordo com os obtidos para o gene LACS neste trabalho com *J. curcas*, indicando que o mesmo possa estar envolvido no processo de catabolismo de ácidos graxos.

#### ❖ **Acil-CoA oxidase (ACX 1)**

O gene ACX 1 (Figura 21) apresentou níveis de transcritos elevados para o desenvolvimento da semente, com o integumento interno atingindo o pico de expressão



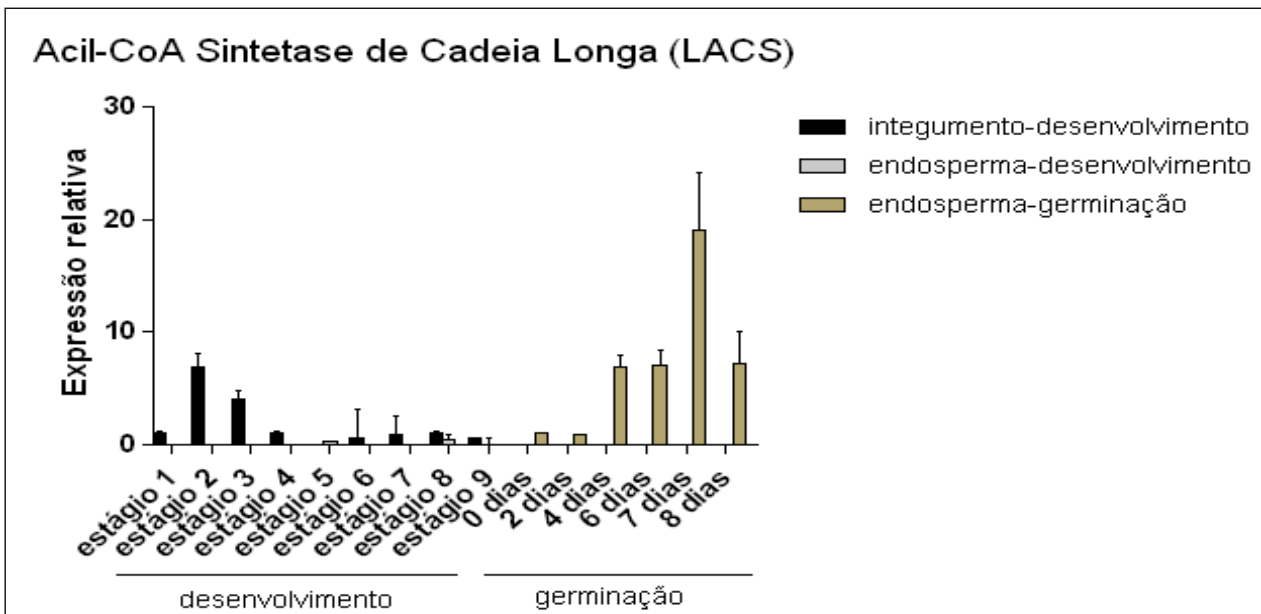


Figura 20. Padrão de expressão relativa do gene Acil-CoA sintetase de cadeia longa (LACS) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de *J. curcas*. Os valores do gráfico indicam a média de expressão das replicatas em relação ao calibrador (1º estágio para o desenvolvimento e 0 dias para a germinação).

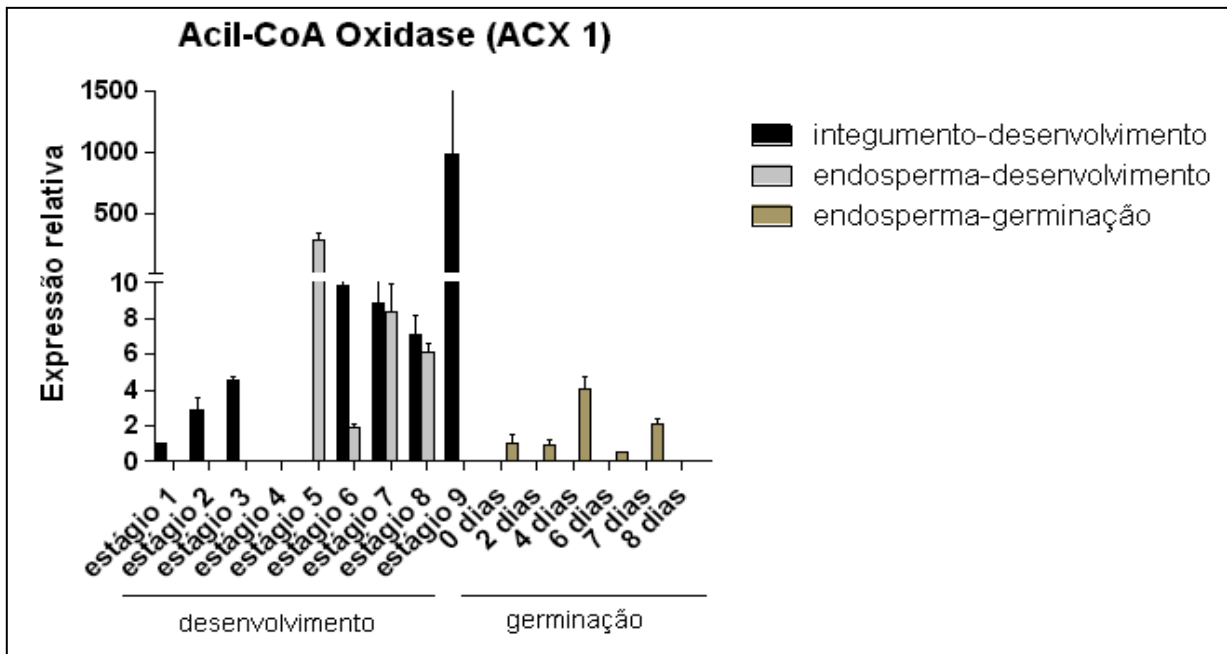


Figura 21. Padrão de expressão relativa do gene Acil-CoA oxidase (ACX 1) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de *J. curcas*. Os valores do gráfico indicam a média de expressão das replicatas em relação ao calibrador (1º estágio para o desenvolvimento e 0 dias para a germinação).

no 9º estágio (982, 151 ± 326, 403), enquanto que para o endosperma a maior expressão foi observada no 5º estágio (285,623 ± 54,456 ). No endosperma em germinação o gene ACX 1 foi pouco expresso, tendo o 4º DAE (4,091 ± 0,682) como o mais expresso.

A ACX é uma enzima que pertence à família das oxidoredutases. No processo de  $\beta$ -oxidação que ocorre principalmente com sementes em germinação a ACX é responsável pelo primeiro passo da via, onde o acil-CoA é oxidado a trans- $\Delta^2$ -enoil-CoA. Seis genes ACX foram identificados em *A. thaliana*, sendo que quatro destes genes já possuem o substrato específico caracterizado bioquimicamente “*in vitro*” (KHAN *et al.*, 2012). O gene ACX 1 catalisa a oxidação de ácidos graxos de C6:0 à C20:0, tendo alta atividade em C12:0 à C16:0 enquanto que a ACX 2 tem como substrato ácidos graxos com C14:0 à C20:0 (HOOKS *et al.*, 1999). ACX 3 atua sobre ácidos graxos C8:0 à C14:0 (EASTMOND *et al.*, 2000). Enquanto que ACX 4 catalisa a oxidação de pequenas cadeias de ácidos graxos C4:0 à C6:0 (HAYASHI *et al.*, 1999).

Khan *et al.*, (2012) observaram que duplos e triplos mutantes de *A. thaliana* são viáveis, mesmo apresentando significativa redução da atividade enzimática da ACX. No entanto, os mesmos autores relatam que o triplo mutante adquire um pequeno defeito na mobilização do óleo e desenvolvimento da plântula. Ryllot *et al.*, (2003) identificaram que a deficiência dos genes ACX 3 e ACX 4 em mutantes de *A. thaliana* é letal para os embriões da planta, sugerindo que a  $\beta$ -oxidação é essencial para a embriogênese. Eastmond *et al.*, (2000) identificaram um novo membro da família das acyl-CoA oxidase com especificidade para ácidos graxos de cadeia média em *A. thaliana*. Os mesmos autores relatam que esta enzima é induzida transcricionalmente durante a germinação da semente e também é expressa constitutivamente no eixo da raiz. Embora a ACX 1 tenha apresentado baixa expressão para a germinação os dados obtidos neste trabalho com *J. curcas*, sugerem que a baixa expressão apresentada por ACX 1 na germinação seja remediada pela sobreposição das outras isoformas deste gene, de modo que a degradação de ácidos graxos não seja afetada. Surpreendentemente, a alta expressão alcançada por ACX 1 durante o desenvolvimento da semente, sugere que além da  $\beta$ -oxidação, o gene ACX 1 possa estar envolvido em outras vias metabólicas.

#### ❖ **Enoil-CoA hidratase (ECH)**

Foi verificado que o nível de transcritos do gene ECH (Figura 22) para os estágios do integumento no desenvolvimento da semente foram baixos, com exceção para o 7º estágio ( $9,129 \pm 0,312$ ). No endosperma em desenvolvimento o gene ECH apresentou atividade transcricional mais aparente, com o 8º estágio ( $16,164 \pm 1,003$ ) sendo o mais expresso. No endosperma em germinação o ECH foi altamente expresso no 4º DAE ( $74,892 \pm 10,387$ ), com os outros dias tendo uma expressão similar à obtida nos estágios do endosperma em desenvolvimento.

Duas das principais reações que acontecem na  $\beta$ -oxidação são produzidas pela proteína multifuncional (MFP), sendo que esta é formada por duas subunidades com atividade enzimática, a enoil-CoA hidratase e a 1,3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (GOEPFERT, *et al.*, 2006). A ECH catalisa a segunda etapa da  $\beta$ -oxidação durante a metabolização de lipídios, onde sua atividade promove a adição de moléculas de água à dupla ligação do trans- $\Delta^2$ -enoil-CoA resultando na formação de  $\beta$ -hidroxiacil-CoA (AGNIHOTRI; LIU, 2003).

Embora a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos seja mais ativa durante a germinação de sementes oleaginosas e senescência foliar, este ciclo também está presente em tecidos fotossintéticos maduros, como nas folhas, bem como no desenvolvimento de sementes (POIRIER, *et al.*, 1999). Goepfert, *et al.*, (2006) analisaram o perfil de expressão do gene ECH em vários tecidos e diferentes estágios da germinação em sementes de *A. thaliana* relatando que o mesmo foi expresso em todos os tecidos estudados, no entanto, evidenciaram que o maior nível de expressão foi identificado nos 1º e 2º dias de germinação e durante a senescência foliar, sugerindo que esses picos de expressão estejam relacionados com a alta atividade da  $\beta$ -oxidação nesses tecidos. Esses dados acrescentam-se aos obtidos neste trabalho, sugerindo que a alta expressão alcançada pelo gene ECH no endosperma em germinação esteja relacionada à alta atividade da  $\beta$ -oxidação na germinação da semente.

#### ❖ **$\beta$ - cetoacil-CoA tiolase (KAT)**

Foi observado que a atividade transcricional da KAT (Figura 23) para o desenvolvimento da semente foi baixo tanto para os estágios do integumento que teve o 7º estágio ( $3,084 \pm 0,185$ ) com o maior nível de expressão, como para os estágios do

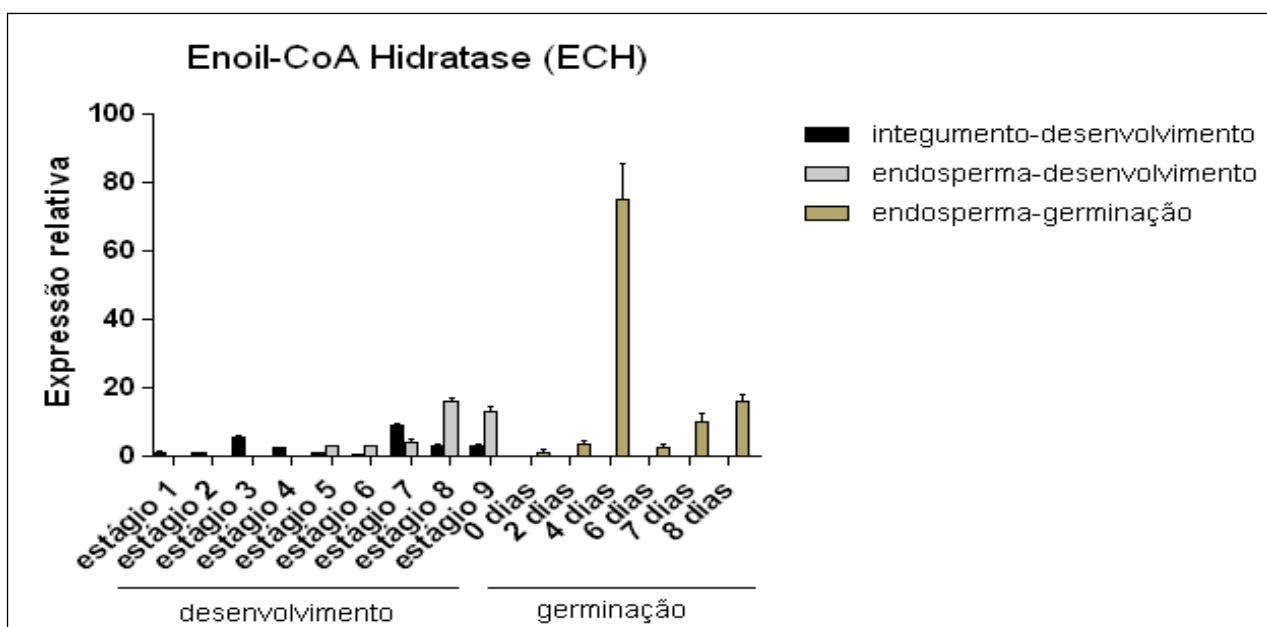


Figura 22. Padrão de expressão relativa do gene Enoil-CoA hidratase (ECH) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de *J. curcas*. Os valores do gráfico indicam a média de expressão das replicatas em relação ao calibrador (1º estágio para o desenvolvimento e 0 dias para a germinação).

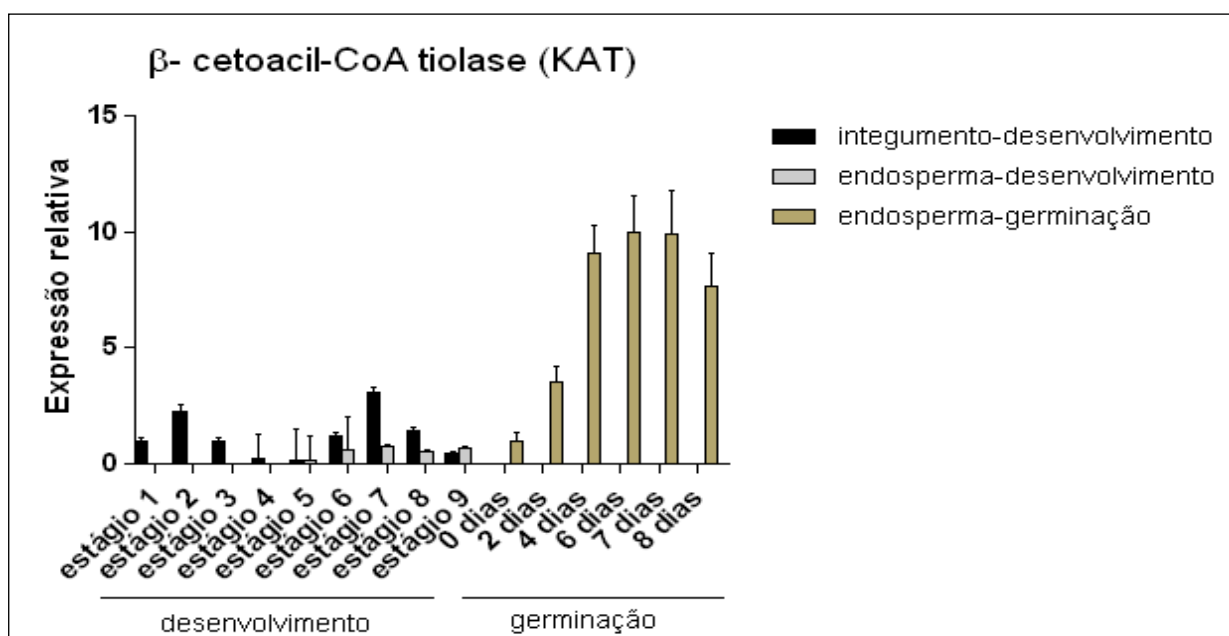


Figura 23. Padrão de expressão relativa do gene β- cetoacil-CoA tiolase (KAT) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de *J. curcas*. Os valores do gráfico indicam a média de expressão das replicatas em relação ao calibrador (1º estágio para o desenvolvimento e 0 dias para a germinação).

endosperma com expressões relativas quase nulas. Na germinação, o gene KAT apresentou uma expressão relativa com crescimento gradual até o 6º DAE ( $10,003 \pm 2,574$ ), com pequena queda nos dias subsequentes.

A  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolase é uma importante enzima envolvida na degradação de ácidos graxos, uma vez que catalisa a última etapa do ciclo da  $\beta$ -oxidação onde promove a clivagem tiolítica da  $\beta$ -cetoacil-CoA produzindo uma molécula de acetil-CoA (GRAHAM, 2008). Segundo Germain *et al.* (2001), *A. thaliana* possui três genes homólogos para a KAT: KAT 1, KAT 2 e KAT 5. O mesmo autor sugere que a KAT2 seja a principal isoforma presente durante a germinação. KAT 1 e KAT 5 são pouco abundantes em plântulas durante a germinação e seus papéis não são bem conhecidos. No entanto, Carrie *et al.*, (2007) sugere que em *A. thaliana* o papel da KAT 2 está relacionado a  $\beta$ -oxidação e que a KAT 5 é co-expressa com genes relacionados a biossíntese de flavonóides.

Germain *et al.*, (2001) constataram que em plântulas de mutantes *kat 2* de *A. thaliana*, houve um acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa ocasionado pela falta da atividade da tiolase KAT 2, indicando que esta teria ácidos graxos de cadeia longa como substrato específico. Os mesmos autores relatam que a KAT 2 atingiu níveis de expressão significativos na germinação e crescimento da plântula. Footitt *et al.*, (2007) ao observarem o perfil de expressão da KAT2, identificaram que a mesma foi expressa em todos os órgãos vegetativos e reprodutivos de *Arabidopsis* testados, sugerindo que a KAT2 e a  $\beta$ -oxidação são importantes para o crescimento, desenvolvimento e sucesso na reprodução da planta. Os níveis de expressão obtidos pela KAT neste trabalho estão em acordo com os trabalhos citados, indicando que a atividade da KAT é importante para o processo de degradação de ácidos graxos na germinação e estabelecimento da plântula.

#### ❖ **Dienoil-CoA redutase (DECR)**

O gene DECR (Figura 24) apresentou baixos níveis de expressão nos estágios observados para o desenvolvimento da semente, onde os estágios do integumento, assim como os estágios do endosperma foram pouco expressos. Na germinação foram detectados os maiores níveis de transcritos para este gene, com o pico de expressão sendo alcançado no 6º DAE ( $7,893 \pm 0,743$ ).

Os ácidos graxos insaturados que compõe as sementes oleaginosas ao serem

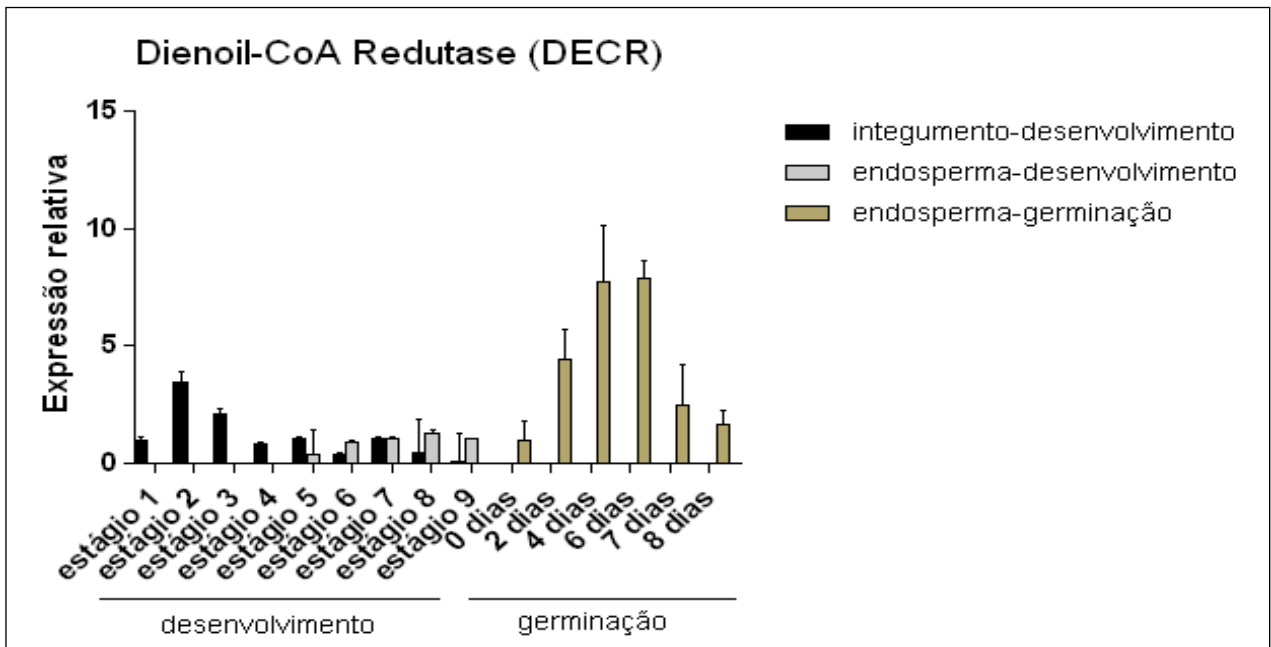


Figura 24. Padrão de expressão relativa do gene Dienoil-CoA redutase (DECR) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de *J. curcas*. Os valores do gráfico indicam a média de expressão das replicatas em relação ao calibrador (1º estágio para o desenvolvimento e 0 dias para a germinação).



degradados produzem o intermediário *2-trans-4-cis-dienoil-CoA*, o que poderia resultar no bloqueio da  $\beta$ -oxidação (GRAHAM, 2008). No entanto duas vias têm sido propostas para a continuidade da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos insaturados: a via hidratase/epimerase e a via redutase/isomerase (SCHULZ, 1987). A DECR atua na via redutase/isomerase onde medeia à conversão do *2-trans-4-cis-dienoil-CoA* em *3-trans-enoil-CoA*, sendo ainda necessária a participação de uma isomerase para que seja formado o substrato adequado à  $\beta$ -oxidação (ROBERT *et al.*, 2005).

Segundo Graham (2008), a atividade do gene DECR tem sido detectada em plantas, no entanto, os genes correspondentes ainda não foram caracterizados. Behrends *et al.*, (1988) observaram as enzimas auxiliares participantes da degradação de ácidos graxos insaturados em plântulas de pepino, sugerindo que a DERC e as outras enzimas auxiliares estariam localizadas na matriz dos glioxissomos. A expressão relativa observada pelo gene DECR neste trabalho, indica que esta enzima esteja relacionada com o processo de degradação de ácidos graxos insaturados durante a germinação da semente.

#### ❖ Acetil-CoA acetiltransferase (ACAT)

Os dados obtidos para a expressão relativa do gene ACAT (Figura 25) revelam que o mesmo teve uma expressão irregular, no entanto, apresentando altas expressões nos estágios estudados. Durante o desenvolvimento da semente, o gene ACAT apresentou maior expressão nos últimos estágios analisados para o integumento, atingindo o maior nível de expressão no 9º estágio ( $107,651 \pm 9,336$ ), enquanto que para os estágios observados no endosperma o maior nível de expressão foi observado no 5º estágio ( $69,934 \pm 7,736$ ). Nos estágios referentes à germinação o ACAT apresentou maior expressão relativa no 7º DAE ( $54,291 \pm 22,325$ ).

A acetil-CoA acetiltransferase (também conhecida como acetoacetil-CoA tiolase) catalisa a reação onde é produzido acetoacetil-CoA a partir da condensação de duas moléculas de acetil-CoA. Pertencente à família das tiolases, esta enzima participa de várias vias metabólicas como a via do mevalonato e biossíntese de terpenóides estando ainda envolvida com outras vias metabólicas segundo dados retirados do Kegg Orthology.

Germain *et al.*, (2001) ao analisarem mutantes de *A. thaliana*, sugeriram que o

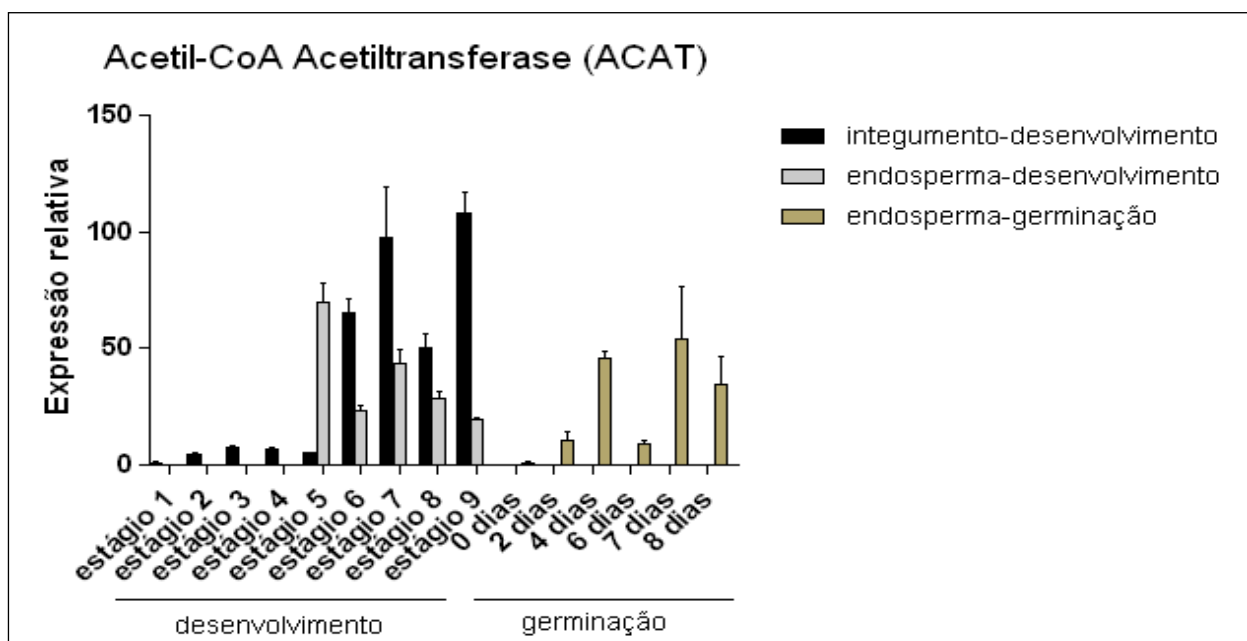


Figura 25. Padrão de expressão relativa do gene Acetil-CoA acetiltransferase (ACAT) obtido por RT-qPCR em amostras do integumento interno e endosperma de sementes em desenvolvimento e germinação de *J. curcas*. Os valores do gráfico indicam a média de expressão das replicatas em relação ao calibrador (1º estágio para o desenvolvimento e 0 dias para a germinação).

acetoacetyl-CoA seria o substrato da  $\beta$ -cetoacetyl-CoA tiolase (KAT). Jin *et al.*, (2012) caracterizaram dois genes para a ACAT em mutantes de *A. thaliana*, denominados ACAT 1 e ACAT 2, sugerindo que a expressão de ACAT 2 é importante para o crescimento e desenvolvimento da planta. Foi observado neste trabalho que o gene ACAT foi altamente expresso em alguns estágios do desenvolvimento e germinação, indicando que o produto originado pela ação da ACAT no caso o acetoacetyl-CoA possa estar envolvido em vias metabólicas fundamentais para a germinação e desenvolvimento da semente.

## 6. CONCLUSÕES

Os genes de referência mais estáveis e considerados apropriados para a normalização de dados por RT-qPCR para a germinação foram EF1- $\alpha$ , PP2A2, GAPDH, PUB3, ACT11, enquanto que para os estágios do desenvolvimento os genes de referência selecionados foram GAPDH, UCP, ACT11, PP2A2 e CICLOF. Esses resultados reforçam a idéia de que não existe gene de referência com estabilidade constante para todas as condições experimentais. Portanto, os genes de referência devem ser testados para cada condição experimental com o intuito de selecionar os mais estáveis. Nossos resultados fornecem uma orientação para a escolha de genes de referência apropriados para a normalização em estudos com sementes em desenvolvimento e germinação de pinhão manso.

Para validar os resultados obtidos para os genes de referência foi utilizado o gene OLEO 3. Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados em artigos científicos pesquisados, indicando que os genes de referência selecionados foram apropriados para a normalização dos dados de RT-qPCR.

Os dados produzidos pela análise de expressão dos genes relacionados com o metabolismo de lipídios por RT-qPCR permitiram traçar um perfil espacial e temporal dos processos de biossíntese e degradação de lipídios na semente de *J. curcas*. Estes resultados fornecem subsídios para o entendimento das bases moleculares envolvidas nestas importantes etapas que ocorrem na semente de *J. curcas*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTEN W. M. J.; VERCHOT L.; FRANKEN Y. J.; MATHIJS E.; SINGH V. P.; AERTS R.; *et al.* *Jatropha* bio-diesel production and use. **Biomass and Bioenergy**, vol. 32, p.1063–1084, 2008.

ADAM, S. E. Toxic effects of *Jatropha curcas* in mice. **Toxicology**, vol. 2, p. 67-76, 1974.

ADOLF, W.; OPFERKUCH, H. J.; HECKER, E. Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. **Phytochemistry**, vol. 23, p. 129-132, 1984.

AGNIHOTRI, G.; LIU, H. Enoyl-CoA Hydratase: Reaction, Mechanism, and Inhibition. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, vol 11, p. 9-20, 2003.

AHMED, O. M.; ADAM, S. E. Effects of *Jatropha curcas* on calves. **Vet. Pathol.**, vol.16, p. 476–482, 1979.

AHMED, O. M.; ADAM, S. E. Toxicity of *Jatropha curcas* in sheep and goats. **Res. Vet. Sci.** vol.27, p. 89, 1979.

AKBAR, E.; YAAKOB, Z.; KAMARUDIN, S. K.; ISMAIL, M.; SALIMON, J. Characteristic and composition of *Jatropha curcas* oil seed from malaysia and its potencial as biodiesel feedstock. **European Journal of Scientific Research**, vol. 29, p. 396-403, 2009.

AKINTAYO, E. T. Characteristics and composition of *Parkia biglobbossa* and *Jatropha curcas* oils and cakes. **Bioresource Technology**, vol. 92, p. 307-310, 2004.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of realtime 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 Res**, vol. 64, p. 5245–5250, 2004.

BANDA, M.; BOMMINENI, A.; THOMAS, R. A.; LUCKINBILL, L. S.; TUCKER, J. D. Evaluation and validation of housekeeping genes in response to ionizing radiation and chemical exposure for normalizing RNA expression in real-time PCR. **Mutat Res** , vol. 649, p. 126–134, 2008.

BANIK, M.; DUGUID, S.; CLOUTIER, S. Transcript profiling and gene characterization of three fatty acid desaturase genes in high, moderate, and low linolenic acid genotypes of flax (*Linum usitatissimum* L.) and their role in linolenic acid accumulation. **Genome**, vol. 54, p. 471-483, 2011.

BATES, P. D.; DURRETT, T. P.; OHLROGGE, J. B.; POLLARD, M. Analysis of Acyl Fluxes through Multiple Pathways of Triacylglycerol Synthesis in Developing Soybean Embryos. **Plant Physiology**, vol. 150, p. 55-72, 2009.

BAUD, S.; GUYON, V.; KRONENBERGER, J.; WUILLÈME, S.; MIQUEL, M.; CABOCHE, M.; LEPINIEC, L.; ROCHAT, C. Multifunctional acetyl-CoA carboxylase 1 is essential for very long chain elongation and embryo development in Arabidopsis. **The Plant Journal**, vol. 33, p. 75-86, 2003.

BAUD, S.; LEPINIEC, L. Regulation of de novo fatty acid synthesis in maturing oilseeds of *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 47, p. 448-455, 2009.

BAUD, S.; LEPINIEC L. Physiological and developmental regulation of seed oil production. **Prog Lipid Res**, vol. 49, p. 235–249, 2010.

BEHRENDTS, W.; THIERINGER, R.; ENGELAND, K.; KUNAU, W.; KINDL, H. The glyoxysomal  $\beta$ -oxidation system in cucumber seedlings: identification of enzymes required for the degradation of unsaturated fatty acids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 263, p. 170-177, 1988.

BECKER, K.; MAKKAR, H. P. S. Effects of phorbol esters in carp (*Cyprinus carpio* L.) **Vet. Hum. Toxicol.**, vol. 40, p. 82–86, 1998.

BERCHMANS, H. J.; HIRATA, S. Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. **Bioresource Technology**, vol. 99, p. 1716-1721, 2008.

BHATLA, S. C.; VANDANA, S.; KAUSHIK, V. Recent developments in the localization of oil body-associated signaling molecules during lipolysis in oilseeds. **Plant Signaling Behavior**, vol. 4, p. 176-182, 2009.

BROWN, A. P., *et al.* Tissue-Specific Whole Transcriptome Sequencing in Castor, Directed at Understanding Triacylglycerol Lipid Biosynthetic Pathways. **Plos One**, vol. 7, p. e30100, 2012.

BRUNNER, A. M.; YAKOVLEV, I. A.; STRAUSS, S. H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. **BMC Plant Biology**, vol. 4, p. 1-7, 2004.

BUCHANAN B. B; GRUISSEM W; JONES R. L: Physiologists ASoP: Biochemistry & Molecular Biology of Plants. MD: **American Society of Plant Physiologists**, Rockville, 2000.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, vol. 29, p. 23, 2002.

CARELS, N. *Jatropha curcas*: a review. **Advances in Botanical Research**, vol. 50, p.39-86, 2009.

CARRIE, C.; MURCHA, M. W.; MILLAR, A. H.; SMITH, S. M.; WHELAN, J. Nine 3-ketoacyl-CoA thiolases (KATs) and acetoacetyl-CoA thiolases (ACATs) encoded by five genes in *Arabidopsis thaliana* are targeted either to peroxisomes or cytosol but not to mitochondria. **Plant Mol Biol**, vol. 63, p. 97-108, 2007.

CANVIN, D. T.; BEEVERS, H. Sucrose synthesis from acetate in the germinating castor bean: kinetics and pathway. **J. Biol. Chem**, vol. 236, p. 988–995, 1961.

CHEN, J. E.; SMITH, A. G. A look at diacylglycerol acyltransferases (DGATs) in

algae. *Journal of Biotechnology*, vol. 162, p. 28-39, 2012.

CHEN, G. Q.; TURNER, C.; HE, X.; NGUYEN, T.; MCKEON, T. A.; LAUDENCIA-CHINGCUANCO, D. Expression profiles of genes involved in fatty acid and triacylglycerol synthesis in castor bean (*Ricinus communis* L.). **Lipids**, vol. 42, p. 263–274, 2007.

CHEN, L.; ZHONG, H.; KUANG, J.; LI, J.; LU, W.; *et al.* Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. **Planta**, vol. 234, p. 377, 2011.

COSTA, G. G. L.; CARDOSO, K. C.; DEL BEM, L.; LIMA, A. C.; CUNHA, M. A. S.; LEITE, M. C.; VICENTINI, R.; PAPES, F.; MOREIRA, R. C.; YUNES, J. A.; CAMPOS, F. A. P.; DA SILVA, M. J. Transcriptome analysis of the oil-rich seed of the bioenergy crop *Jatropha curcas* L. **BMC Genomics**, vol. 11, p. 1-9, 2010.

CUNHA, M. A. S. Análise da expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios em sementes de *Jatropha curcas* L. 2011. 95f. (Doutorado em Biotecnologia-RENORBIO). **Universidade Federal do Ceará-UFC**. Fortaleza, Ceará. 2011.

DE BOER, G. *et al.* The NADH-specific enoyl-acyl Carrier protein reductase: Characterization of a housekeeping gene involved in storage lipid synthesis in seeds of arabidopsis and other plant species. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 36, p. 473-486, 1998.

DEVAPPA, R. K.; RAJESH, S. K.; KUMAR, V.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Activities of *Jatropha curcas* phorbol esters in various bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 78, p. 57-62, 2012.

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

DUDLEY, M. W.; DUEBER, M. T.; WEST, C. A. Biosynthesis of the macrocyclic diterpene casbene in castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings: changes in enzymes levels induced by fungal infection and intracellular localization of the pathway. **Plant Physiol.** Vol. 81, p. 335–342, 1986.

DUEBER, M.T.; ADOLF, W.; WEST, C.A. Biosynthesis of the diterpene phytoalexin casbene: partial purification and characterization of casbene synthetase from *Ricinus communis*. **Plant Physiol.**, vol. 62, p. 598–603, 1978.

DYER, J. M.; STYMNE, S.; GREEN, A. G.; CARLSSON, A. S. High-value oils from plants. **The Plant Journal**, vol. 54, p. 640-655, 2008.

EASTMOND, P. J. Sugar-dependent1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating arabidopsis seeds. **The Plant Cell**, vol. 18, p. 665-675, 2006.

EASTMOND, P. J.; HOOKS, M. A.; WILLIAMS, D.; LANGE, P.; BECHTOLD, N.; SARROBERT, C.; NUSSAUME, L.; GRAHAM, I. A. Promoter Trapping of a Novel

Medium-chain Acyl-CoA Oxidase, Which Is Induced Transcriptionally during *Arabidopsis* Seed Germination. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 275, p. 34375-34381, 2000.

EVANS, F. J. Environmental hazards of diterpene esters from plants. In: Evans, F. J. Naturally occurring phorbol esters. **CRC press**, Boca Raton, p. 1–31, 1986.

FAWCETT, T.; SIMON, W. J.; SWINHOE, R.; SHANKLIN, J.; NISHIDA, I.; CHRISTIE, W. W.; SLABAS, A. R. Expression of mRNA and steady-state levels of protein isoforms of enoyl-ACP reductase from *Brassica napus*. **Plant Molecular Biology**, vol. 26, p. 155-163, 1994.

FELKE, J. The poisonous principles of the seeds of *Jatropha curcas* Linn. **Landw Versuchsw**, vol. 82, p. 427-30, 1914.

FERRARI, R. A. *et al.* Avaliação da composição química e de constituinte tóxico em acessos de pinhão-mansão de diferentes origens. **Braz. J. Food Technology**, v. 12, n. 4, p. 309-314, 2009.

FISCHER, K.; WEBER, A. Transport of carbon in non-green plastids. **Trends Plant Sci**, vol 7, p. 345–351, 2002.

FOOTITT, S.; CORNAH, J. E.; PRACHAROENWATTANA, I.; BRYCE, J. H.; SMITH, S. M. The *Arabidopsis* 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 (*kat2-1*) mutant exhibits increased flowering but reduced reproductive success. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-10, 2007.

FULDA, M.; SHOCKEY, J.; WEBER, M.; WOLTER, F. P.; HEINZ, E. Two long-chain acyl-CoA synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation. **The Plant Journal**, vol. 32, p. 93-103, 2002.

FULDA, M.; SCHNURR, J.; ABBADI, A.; HEINZ, E.; BROWSE, J. Peroxisomal Acyl-CoA Synthetase Activity Is Essential for Seedling Development in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, vol. 16, p. 394-405, 2004.

GENORM. **Normalization of real-time PCR expression data**. 2002. [http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/geNorm\\_manual.pdf](http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/geNorm_manual.pdf) . Acessado em: 28 de dezembro de 2012.

GERMAIN, V.; RYLOTT, E. L.; LARSON, T. R.; SHERSON, S. M.; BECHTOLD, N.; CARDE, J. P.; BRYCE, J. H.; GRAHAM, I. A.; SMITH, S. M. Requirement for 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 in peroxisome development, fatty acid  $\beta$ -oxidation and breakdown of triacylglycerol in lipid bodies of *Arabidopsis* seedlings. **The Plant Journal**, vol. 28, p. 1-12, 2001.

GOEL, G.; MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals. **International Journal of Toxicology**, vol. 26, p. 279-288, 2007.

GOEPFERT, S.; POIRIER, Y.  $\beta$ -Oxidation in fatty acid degradation and beyond.



**Current Opinion in Plant Biology**, vol. 10, p. 245-251, 2007.

GOEPFERT, S.; HILTUNEN, J. K.; POIRIER, Y. Identification and functional characterization of monofunctional peroxisomal Enoyl-CoA Hydratase 2 that participates in the degradation of even cis-unsaturated fatty acids in *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 281, p. 35894-35903, 2006.

GONZÁLEZ-MELLADO, D.; WETTSTEIN-KNOWLES, P. VON.; GARCÉS, R.; MARTÍNEZ-FORCE, E. The role of  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III in the condensation steps of fatty acid biosynthesis in sunflower. **Planta**, vol. 231, p. 1277-1289, 2010.

GRAHAM, I. A. Seed storage oil mobilization. **Annu. Rev Plant Biol.**, vol. 59, p. 115–142, 2008.

GU, K.; CHIAM, H.; TIAN, D.; YIN, Z. Molecular cloning and expression of heteromeric ACCase subunit genes from *Jatropha curcas*. **Plant Science**, vol. 180, p. 642-649, 2011.

GU, K.; YI, C.; TIAN, D.; SANGHA, J. S.; HONG, Y.; YIN, Z. Expression of fatty acid and lipid biosynthetic genes in developing endosperm of *Jatropha curcas*. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 5, p. 1-15, 2012.

GUTIERREZ, L.; MAURIAT, M.; GUÉNIN, S.; PELLOUX, J.; LEFEBVRE, J.; *et al.* The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**, vol. 6, p. 609-618, 2008.

HAAS, W.; STRERK, H.; MITTELBAACH, M. Novel 12-deoxy-16-hydroxyphorbol diesters isolates from the seed oil of *Jatropha curcas*. **J.Nat.Prod**, vol.65, p.1434–1440, 2002.

HARTLEY, M. R.; LORD, J. M. Genetics of ribosome inactivating proteins. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, vol. 4, p. 487–492, 2004.

HAYASHI, H.; BELLIS, L.; CIURLI, A.; KONDO, M.; HAYASHI, M.; NISHIMURA, M. A novel Acyl-CoA Oxidase that can oxidize short-chain Acyl-CoA in plant peroxisomes. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 274, p. 12715-12721, 1999.

HE, X.; CHEN, G. Q.; LIN, J.; MCKEON, T. A. Diacylglycerol Acyltransferase Activity and Triacylglycerol Synthesis in Germinating Castor Seed Cotyledons. **Lipids**, vol. 41, p. 281-285, 2006.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**, vol. 8, p.19, 2007.

HOOKS, M. A.; KELLAS, F.; GRAHAM, I. A. Long-chain acyl-CoA oxidases of

- Arabidopsis. **The Plant journal**, vol. 20, p. 1-13, 1999.
- HU, J.; BAKER, A.; BARTEL, B.; LINKA, N.; MULLEN, R. T.; REUMANN, S.; ZOLMAN, B. K. Plant Peroxisomes: Biogenesis and Function. **The Plant Cell**, vol. 24, p. 2279-2303, 2012.
- HU, R.; FAN, C.; LI, H.; ZHANG, Q.; FU, F. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, vol. 10, p. 1-12, 2009.
- HUANG, A. H. C. Oil bodies and oleosins in seeds. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, vol. 43, p. 177–200, 1992.
- HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalization. Strategies and considerations. **Genes Immun**, vol.6, p. 279-284, 2005.
- ICHIHARA, K.; TAKAHASHI, T.; FUJII, S. Diacylglycerol Acyltransferase in Maturing Safflower Seeds-Its Influences on the Fatty-Acid Composition of Triacylglycerol and on the Rate of Triacylglycerol Synthesis. **Biochimica Et Biophysica Acta**, vol. 958, p. 125-129, 1998.
- JAWORSKI J. G.; TAI, H.; OHLROGGE, J. B.; POST-BEITTENMILLER, D. The initial reactions of fatty acid biosynthesis in plants. **Prog. Lipid Res.**, vol. 33, p. 47–54, 1994.
- JIANG, H.; WU, P.; ZHANG, S.; SONG, C.; CHEN, Y.; LI, M.; JIA, Y.; FANG, X.; CHEN, F.; WU, G. Global Analysis of Gene Expression Profiles in Developing Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) Seeds. **Plos One**, vol. 7, p. 1-12, 2012.
- JIN, H.; SONG, Z.; NIKOLAU, B. J. Reverse genetic characterization of two paralogous acetoacetyl CoA thiolase genes in Arabidopsis reveals their importance in plant growth and development. **The Plant Journal**, vol. 70, p. 1015-1032, 2012.
- JONES, A.; DAVIES, H. M.; VOELKER, T. A. Palmitoyl-acyl carrier protein (acp) thioesterase and the evolutionary-origin of plant acyl-acp thioesterases. **Plant Cell.**, vol. 7, p. 359–371, 1995.
- KARANTONIS, H. C.; NOMIKOS, T.; DEMOPOULOS, C. A. Triacylglycerol Metabolism. **Current Drug Targets**, vol. 10, p. 302–319, 2009.
- KE, J.; WEN, T. N.; NIKOLAU, B. J.; WURTELE, E.S. Coordinate regulation of the nuclear and plastidic genes coding for the subunits of the heteromeric acetyl-coenzyme A carboxylase. **Plant Physiol.** vol. 122, p. 1057-1071, 2000.
- KELLY, A. A.; QUETTIER, A.; SHAW, E.; EASTMOND, P. J. Seed Storage Oil Mobilization Is Important But Not Essential for Germination or Seedling Establishment in Arabidopsis. **Plant Physiology**, vol. 157, p. 866-875, 2011.
- KHAN, B.R.; ADHAM, A. R.; ZOLMAM, B. K. Peroxisomal Acyl-CoA oxidase 4 activity differs between *Arabidopsis* accessions. **Plant Mol Bio**, vol. 78, p. 45-78, 2012.

KING, A. J.; HE, W.; CUEVAS, J. A. *et al.*, Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. **Journal of Experimental Botany**, vol. 60, p. 2897-2905, 2009.

KIRBY, J. *et al.* Cloning of casbene and neocembrene synthases from Euphorbiaceae plants and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, vol. 71, p. 1446-1473, 2010.

KOH, Y. M.; GHAZY, T. I. M. A review of biodiesel production from *Jatropha curcas* L. oil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 15, p. 2240-2251, 2011.

KONISHI T.; SHINOHARA K.; YAMADA K.; SASAKI Y. Acetyl-CoA carboxylase in higher plants: most plants other than gramineae have both the prokaryotic and eukaryotic forms of this enzyme, **Plant Cell Physiol**, Vol. 37, p. 117–122, 1996.

KONISHI, T.; SASAKI, Y. Compartmentalization of two forms of acetyl-CoA carboxylase in plants and the origin of their tolerance toward herbicides. **Proc. natl acad. sci. usa**, vol. 91, p. 3598-3601, 1994.

KOO, A. J. K.; OHLROGGE, J. B.; POLLARD, M. On the export of fatty acids from the chloroplast. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 279, p. 16101–16110, 2004.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 5<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 653.

LI, Q.; FAN, C.; ZHANG, X.; FU, Y. Validation of reference genes for real-time quantitative PCR normalization in soybean developmental and germinating seeds. **Plant Cell Rep**, DOI 10.1007/s00299-012-1282-4, 2012.

LI, J.; LI, M.; WU, P.; TIAN, C.; JIANG, H.; WU, G. Molecular cloning and expression analysis of a gene encoding a putative -ketoacyl-acyl carrier protein (ACP) synthase III (KAS III) from *Jatropha curcas*. **Tree Physiology**, vol. 28, p. 921-927, 2008.

LIANG, Q.; YAN, S. Y.; LI, Y.; CHEN, K. S.; HE, W. Q.; HE, L. L. Study on extracting the poisonous protein from the seed of *Jatropha*. **Chem. Res. Applic.** Vol. 17, p. 737–740, 2005.

LIN, J.; YAN, F.; TANG, L.; CHEN, F. Anti-tumor effects of curcumin from seeds of *Jatropha curcas*. **Acta Pharmacologica Sinica**. Vol. 24, p. 241–246, 2003.

LIU, Q.; SILOTO, R. M. P.; LEHNER, R.; STONE, S. J.; WESELAKE, R. J. Acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase: Molecular biology, biochemistry and biotechnology. **Progress in lipid Research**, vol. 51, p. 350-377, 2012.

LIU, S. Y.; SPORER, F.; WINK, M.; JOURDANE, J.; HENNING, R.; LI, Y. L.; RUPPEL, A. Anthraquinones in *Rheum palmatum* and *Rumex dentatus* (Polygonaceae), and phorbol esters from *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) with molluscicidal activity

against the schistosomias vector snails *Oncomelania*, *Biomphalaria* and *Bulinus*. **Tropical Medicine and International Health**, vol. 2, p. 179–188, 1997.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using Real time quantitative PCR and  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Method**, vol 25, p. 402-408, 2001.

LU, C. L.; NOYER, S. B.; HOBBS, D. H.; KANG, J.; WEN, Y.; KRACHTUS, D.; HILLS, M. Expression pattern of diacylglycerol acyltransferase-1, an enzyme involved in triacylglycerol biosynthesis, in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, vol. 52, p. 31-41, 2003.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. **Journal of Agricultural Science**, vol. 128, p. 311–322, 1997.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SPORER, F.; WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal Agric. Food Chemistry**, vol. 45, p. 3152-3157, 1997.

MARSHALL, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics**, vol. 20(15), p. 2471-2472, 2004.

MISRA, M.; MISRA, A. N. *Jatropha*: The Biodiesel Plant Biology, Tissue Culture and Genetic Transformation – A Review. **Int. J. Pure Appl. Sci. Technol.**, vol. 1, p. 11-24, 2010.

MORENO-PEREZ, A. J.; VENEGAS-CALERÓN, M.; VAISTIJ, F. E.; SALAS, J. J.; *et al.* Reduced expression of FatA thioesterases in *Arabidopsis* affects the oil content and fatty acid composition of the seeds. **Planta**, vol. 235, p. 629-639, 2012.

MOU, Z.; HE, Y.; DAI, Y.; LIU, X.; AND LI, J. Deficiency in fatty acid synthase leads to premature cell death and dramatic alterations in plant morphology. **Plant Cell**, vol. 12, p. 405–418, 2000.

MUKHERJEE, K. D., Plant lipases and their application in lipid biotransformations. **Prog. lipid Res.**, vol. 33, p. 165-174, 1994.

MUKHERJEE, P.; VARSHNEY, A.; JOHNSON, T. S.; JHA, T. B. *Jatropha curcas*: a review on biotechnological status and challenges. **Plant Biotechnol Rep.**, vol. 5, p. 197-215, 2011.

NAKANO, Y.; OHTANI, M.; POLSRI, W.; USAMI, T.; SAMBONGI, K.; DEMURA, T. Characterization of the casbene synthase homolog from *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.). **Plant Biotechnology**, vol. 29, p. 185-189, 2012.

NITHIYANANTHAM, S.; SIDDHURAJU, P.; FRANCIS, G. Potential of *Jatropha curcas* as a Biofuel, Animal Feed and Health Products. **J Am Oil Chem Soc**, vol. 89, p. 961-972, 2012.

O'HARA, P.; SLABAS, A. R.; FAWCETT, T. Fatty Acid and Lipid Biosynthetic Genes Are Expressed at Constant Molar Ratios But Different Absolute Levels during

- Embryogenesis. **Plant Physiology**, vol. 129, p. 310-320, 2002.
- O'HARA, P.; SLABAS, A. R.; FAWCETT, T. Antisense Expression of 3-Oxoacyl-ACP Reductase Affects Whole Plant Productivity and Causes Collateral Changes in Activity of Fatty Acid Synthase Components. **Plant Cell Physiology**, vol. 48, p. 736-744, 2007.
- OHLROGGE, J.; BROWSE, J. Lipid Biosynthesis. **The Plant Cell**, vol. 7, p. 957-970, 1995.
- OHLROGGE, J. B.; JAWORSKI J. G. Regulation of fatty acid synthesis. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, vol. 48, p. 109-136, 1997.
- OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, vol. 19, p. 1-15, 2000.
- PANDEY, V. C.; SINGH, K.; SINGH, J. S.; KUMAR, A.; SINGH, B.; SINGH, R. P. *Jatropha curcas*: A potential biofuel plant for sustainable environmental. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 16, p. 2870-2883, 2012.
- PARAWIRA, W. Biodiesel production from *Jatropha curcas*: A review. **Scientific Research and Essays**, vol. 5, p. 1796-1808, 2010.
- PARTHIBANE, V.; RAJAKUMARI, S.; VENKATESHWARI, V.; IYAPPAN, R.; RAJASEKHARAN, R. Oleosin is bifunctional enzyme that has both monoacylglycerol acyltransferase and phospholipase activities. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 287, p. 1946-1954, 2012.
- PERRY H. J.; HARWOOD J. L. Changes in the lipid content of developing seeds of *Brassica napus*. **Phytochemistry**, vol. 32, p. 1411-1415, 1993.
- PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P.; Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol Lett**, vol. 26, p. 509–515, 2004.
- PLEITE, R.; MARTÍNEZ-FORCE, E.; GARCÉS, R. Inhibitors of fatty acid biosynthesis in sunflower seeds. **Journal of Plant Physiology**, vol. 163, p. 885-894, 2006.
- POGHOSYAN, Z. P. Temporal and transient expression of olive enoyl-ACP reductase gene during flower and fruit development. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 43, p. 37-44, 2005.
- POIRIER, Y.; VENTRE, G.; CALDELARI, D. Increased Flow of Fatty Acids toward  $\beta$ -Oxidation in Developing Seeds of Arabidopsis Deficient in Diacylglycerol Acyltransferase Activity or Synthesizing Medium-Chain-Length Fatty Acids. **Plant Physiology**, vol. 121, p. 1359-1366, 1999.
- POPLUECHAI, S.; FROISSARD, M.; JOLIVET, P.; BREVIARIO, D.; GATEHOUSE, A. M. R.; O'DONNELL, A. G.; CHARDOT, T.; KOHLY, A. *Jatropha curcas* oil body proteome and oleosins: L-form JcOle3 as a potential phylogenetic marker. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 49, p. 352-356, 2011.

RAO, G. R.; KORWAR, G. R.; SHANKER, A. K.; RAMAKRISHNA, Y. S. Genetic associations. variability and diversity in seed characters, growth, reproductive phenology and yield in *Jatropha curcas* (L.) accessions. **Trees**, vol. 22, p. 697-709, 2008.

RAWSTHORNE, STEPHEN. Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. **Progress in Lipid Research**, vol. 41, p. 182-196, 2002.

REMANS, T.; SMEETS, K.; OPDENAKKER, K.; MATHIJSEN, D.; VANGRONSVELD, J.; CUYPENS, A. Normalization of real time PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentration. **Planta**, vol. 227(6), p.1343-1349, 2008.

ROBERT, J.; MARCHESINI, S.; DELESSERT, S.; POIRIER, Y. Analysis of the  $\beta$ -oxidation of trans-unsaturated fatty acid in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a peroxisomal PHA synthase reveals the involvement of a reductase dependent pathway. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1734, p. 169-177, 2005.

ROCHA, A. J. Análise da expressão gênica de proteinases cisteínicas relacionadas à morte celular programada e à maturação de proteínas de reservas em sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) 82f. **Universidade Federal do Ceará-UFC**. Fortaleza, Ceará. 2012.

RUUSKA, S.A.; GIRKE, T.; BENNING, C.; OHLROGGE, J.B.; Contrapuntal networks of gene expression during *Arabidopsis* seed filling. **Plant Cell**, vol. 14, p. 1191–1206, 2002.

RYLOTT, E. L.; ROGERS, C. A.; GILDAY, A. D.; EDGELL, T.; LARSON, T. R.; GRAHAM, I. A. *Arabidopsis* mutants in short- and medium-chain Acyl-CoA Oxidase activities accumulate Acyl-CoAs and reveal that fatty acid  $\beta$ -oxidation is essential for embryo development. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 278, p. 21370-21377, 2003.

SÁNCHEZ-GARCÍA, A.; MORENO-PÉREZ, A. J.; MURO-PASTOR, A. M.; SALAS, J. J.; GARCÉS, R.; MARTÍNEZ-FORCE, E. Acyl-ACP thioesterases from castor (*Ricinus communis* L.): an enzymatic system appropriate for high rates of oil synthesis and accumulation. **Phytochemistry**, vol. 71, p.860–869, 2010.

SASAKI, Y.; NAGANO, Y. Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, vol. 68, p.1175–1184, 2004.

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by realtime, quantitative RT-PCR. **J Biochem Biophys Meth**, vol. 46, p. 69–81, 2000.

SCHNURR, J.; SHOCKEY, J.; BROWSE, J. The Acyl-CoA Synthetase Encoded by LACS2 Is Essential for Normal Cuticle Development in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, vol. 16, p. 629-642, 2004.

SCHUCH, R.; BRUMMEL, M.; SPENER, F.  $\beta$ -Ketoacyl acyl carrierprotein (ACP) synthase III in *Cuphea lanceolata* seeds: identification and analysis of reaction products. **J. Plant Physiol.** Vol. 143, p.556–560, 1994.

SCHULZ, H.; KUNAU, W. Beta-oxidation of unsaturated fatty acids: a revised pathway. **Trends Biochem. Sci.**, vol. 12, p. 403-406, 1987.

SHIMAKATA, T.; STUMPF, P. Isolation and function of spinach leaf b-ketoacyl-[acyl carrier protein] synthases. **Proc Natl Acad Sci USA.** Vol. 79, p. 5808–5812, 1982.

SHOCKEY, J. M.; FULDA, M. S.; BROWSE, J. A. Arabidopsis contains nine long-chain acyl-coenzyme A synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. **Plant Physiology**, vol. 129, p. 1710-1722, 2002.

SILVA, R. G.; ROSADO, L. A.; SANTOS D. S.; BASSO, L. A. Mycobacterium tuberculosis b-ketoacyl-ACP reductase:  $\alpha$ -Secondary kinetic isotope effects and kinetic and equilibrium mechanisms of substrate binding. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 471, P. 1-10, 2008.

STIRPE, F.; PESSION-BRIZZI, A.; LORENZONI, E.; STROCHI, P.; MONTANARO, L.; SPERTI, S. Studies on the protein from the seeds of *Croton tiglium* and *Jatropha curcas*. **Biochem. J.**, vol.156, p. 1-6, 1976.

THEODOULOU, F. L.; EASTMOND, P. J. Seed storage oil catabolism: a story of give and take. **Current Opinion in Plant Biology**, vol. 15, p. 322-328, 2012.

TONG, Z.; GAO, Z.; WANG, F.; ZHOU, J.; ZHANG, Z. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, vol. 10, p. 1-13, 2009.

TURCHETTO-ZOLET *et al.*. Evolutionary view of acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase (DGAT), a key enzyme in neutral lipid biosynthesis. **BMC Evolutionary Biology**, vol. 11, p. 263, 2011.

UDVARDI, M. K.; CZECHOWSKI, T.; SCHEIBLE, W. R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. **Plant Cell**, vol. 20, p. 1736–1737, 2008.

VANDESOMPELE J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple control genes. **Genome Biol**, vol.7, n° 7, p. 1-12, 2002.

VOELKER, T. Plant acyl-ACP thioesterases: chain-length determining enzymes in plant fatty acid biosynthesis. **Genet. Eng.** Vol.18, p. 111–133, 1996.

VOELKER, T.; KINNEY, A. J. Variations in the Biosynthesis of Seed-Storage Lipids. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, vol. 52, p. 335-361, 2001.

WEI, Q.; LI, J.; ZHANG, L.; WU, P.; CHEN, Y.; LI, M.; JIANG, H. Cloning and characterization of a  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *Jatropha curcas*. **Jornaul of Plant Physiology**, vol. 169, p. 816-824, 2012.

WEI, Q.; LIAO, Y.; ZHOU, L. J.; ZHOU, J. X.; WANG, S. H.; CHEN, F. Antifungal activity of curcumin from seeds of *Jatropha curcas*. **Chinese Journal of Oil Crop Sci.** vol. 26, p. 71–75, 2004.

WINK, M.; KOSCHMIEDER, C.; SAUERWEIN, M.; SPORER, F. Phorbol esters of *Jatropha curcas* — Biological activities and potential applications. In: Biofuel and industrial products from *Jatropha curcas*. Ed. **Gübitz, Mittelbach and Trabi**, Graz, Austria. p. 160–166, 1997.

WU, P. Z.; LI, J.; WEI, Q.; ZENG, L.; CHEN, Y. P.; LI, M. R.; JIANG, H. W.; WU, G. J. Cloning and functional characterization of an acyl-acyl carrier protein thioesterase (JcFATB1) from *Jatropha curcas*. **Tree Physiology**, vol. 29, p. 1299-1305, 2009.

WU, G.; XUE, H. *Arabidopsis*  $\beta$ -Ketoacyl-(Acyl Carrier Protein) Synthase I Is Crucial for Fatty Acid Synthesis and Plays a Role in Chloroplast Division and Embryo Development. **The Plant Cell**, vol. 22, p. 3726-3744, 2010.

XIAO, J.; ZHANG, H.; NIU, L.; WANG, X.; LU, X. Evaluation of Detoxification Methods on Toxic and Antinutritional Composition and Nutritional Quality of Proteins in *Jatropha curcas* Meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 59, p. 4040-4044, 2011.

YE, J.; QU, J.; BUI, H. T. N.; CHUA, N. Rapid analysis of *Jatropha curcas* gene functions by virus-induced silencing. **Plant Biotechnology Journal**, vol. 7, p. 964-976, 2009.

YEN, C. E.; STONE, S. J.; KOLIWAD, S.; HARRIS, C.; FARESE, R. V. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. **Journal of Lipid Research**, vol. 49, p. 2283-2301, 2008.

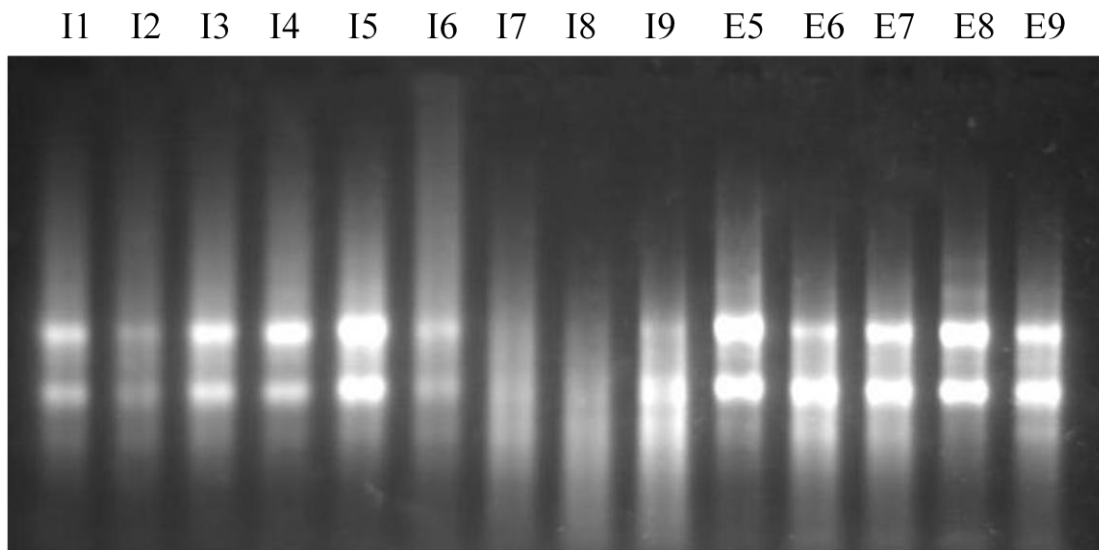
ZHAO, Q.; WANG, W.; WANG, Y.; XU, Y.; CHEN, F. The effect of curcumin from *Jatropha curcas* on apoptosis of mouse sarcoma-180 cells. **Fitoterapia**, vol. 83, p. 849-852, 2012.

ZHONG, Y.; TAYLOR, J.; WILLIAMS, M. The End: Senescence and Cell Death. **The Plant Cell**, doi 10.1105, p. 1-13, 2012.

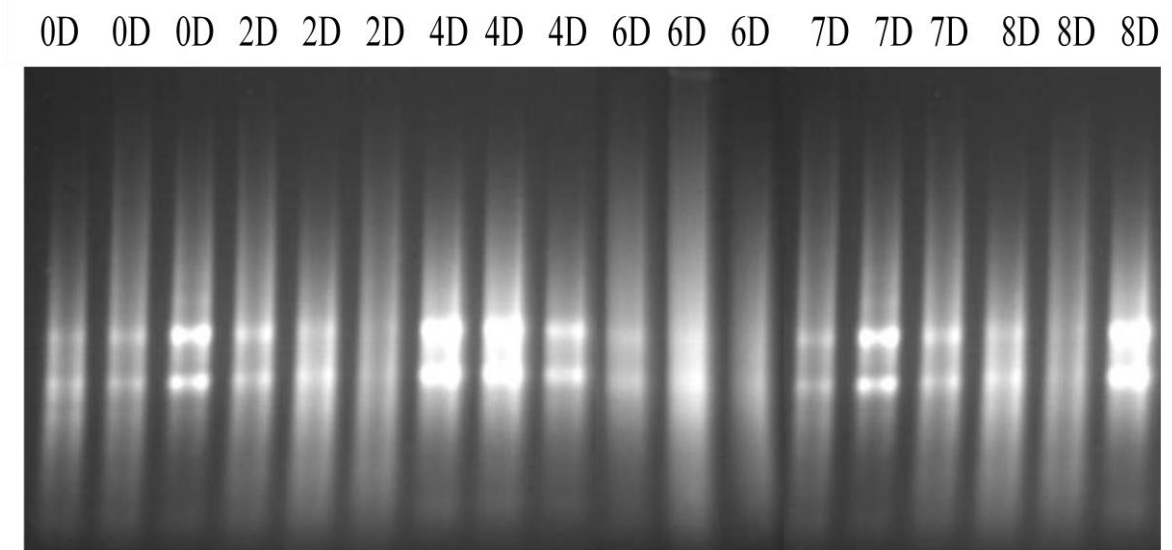
ZHU, X.; LI, X.; CHEN, W.; *et al.*, Evaluation of New Reference Genes in Papaya for Accurate Transcript Normalization under Different Experimental Conditions. **Plos One**, vol. 7, p. 1-14, 2012.



## 8. ANEXOS



Eletroforese de RNA total purificados de integumento e endosperma de sementes de *J. curcas* em gel de agarose 1,2%. O gel de agarose 1,2% refere-se aos estágios do integumento em desenvolvimento I1, I2, I3, I4, I5, I6, I7, I8 e I9 e aos estágios do endosperma em desenvolvimento no caso E5, E6, E7, E8 e E9.



Eletroforese de RNA total purificados de endosperma de sementes de *J. curcas* em gel de agarose 1,2%. O gel de agarose 1,2% refere-se aos estágios do endosperma em germinação 0 dias (0D), 2 dias (2D), 4dias ( 4D), 6 dias (6D), 7dias (7D) e 8dias (8D) os quais aparecem em triplicata.