

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

THOMAZ STUMPF TRENZ

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS ENZIMAS DO TIPO DIACILGLICEROL
ACETILTRANSFERASE (DAcT) E DIACILGLICEROL ACILTRANSFERASE SOLÚVEL
(DGAT3) DE MAMONA (*Ricinus communis*)

Porto Alegre

2015

THOMAZ STUMPF TRENZ

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS ENZIMAS DO TIPO DIACILGLICEROL
ACETILTRANSFERASE (DacT) E DIACILGLICEROL ACILTRANSFERASE SOLÚVEL
(DGAT3) DE MAMONA (*Ricinus communis*)**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como
parte dos requisitos necessários para a obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Felipe dos Santos Maraschin

Porto Alegre

2015

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Felipe dos Santos Maraschin, pela paciência, credibilidade e orientação durante toda a minha graduação;

À Professora Márcia Margis, por ter aberto as portas de seu laboratório e por estar sempre disposta a me ajudar;

Aos meus colegas de laboratório, em especial ao Ronei, Lauro, Fernanda e Leila. Aprendi com eles que ciência não se faz sozinho;

Aos meus pais, Jorge e Carla, e ao meu padrasto, Gilberto, que me proporcionaram tudo que sempre precisei, além de estarem comigo em todos os momentos difíceis;

Às minhas irmãs, Thaís e Tanara, e minha amiga Marcia Treis, por me apoiarem;

Aos meus colegas e amigos de curso, em especial ao time dos Copeiros;

Ao Professor Eliseu e a Tania, por terem aceitado e colaborado neste trabalho;

Aos Professores Rogério e Henrique, por servirem como inspiração;

Aos professores Alexandro, Andréia e todas as outras pessoas que, de alguma forma, contribuíram com este trabalho;

Ao CNPq, FAPERGS e CAPES pelo apoio financeiro.

Muito obrigado!

Resumo

Triacilgliceróis (TAGs) são a principal forma de estoque de lipídeos em sementes de plantas. As propriedades químicas dos TAGs dependem da composição de seus ácidos graxos. As Diacilglicerol Aciltransferases (DGATs) são as principais enzimas para a biossíntese de TAGs e catalisam a condensação de diacilglicerol (DAG) com ácidos graxos para a formação do principal componente dos óleos vegetais, os TAGs. Diferentes tipos de genes de DGATs (nomeados como DGAT1, DGAT2, DGAT3 e DAcT) têm sido identificados em plantas. DGAT1 e DGAT2 são bem caracterizados, mas pouco é sabido sobre a DGAT3 e a DAcT na maioria das espécies. O entendimento da via enzimática da biossíntese de TAGs, e sua regulação em plantas, é importante para ajudar a melhorar o conteúdo de óleos nutricionais e industriais. O óleo de mamona (*Ricinus communis*) possui altos níveis de ácido ricinoléico, um ácido graxo “não usual” com características únicas que o tornam interessante para a indústria. Este trabalho objetivou caracterizar os genes de DGAT3 e DAcT em mamona. Foram identificados quatro diferentes genes homólogos da DAcT (DAcTA, DAcTB, DAcTC e DAcTD) e um homólogo para DGAT3 em mamona. Foram caracterizados os padrões de expressão de DGAT3 e DAcTA por meio de RT-qPCR em 5 diferentes estágios do desenvolvimento da semente de mamona, onde foi verificado que DGAT3 é expresso; entretanto, não foi possível identificar expressão considerável das DAcTs no desenvolvimento da semente de mamona. Através da expressão em protoplastos de folhas de *Arabidopsis thaliana* de fusões traducionais a YFP, tanto a DGAT3 quanto a DAcTA foram visualizadas em microscópio confocal para identificar sua localização subcelular. A DAcTA parece se comportar igual as outras DGATs, associando-se a membranas do retículo endoplasmático; porém, DGAT3 pareceu ter uma localização diferente das outras DGATs, que foi confirmada como citoplasmática. Linhagens de *A. thaliana* expressando RcDGAT3-CFP foram obtidas. Sementes T3 homozigotas dessas plantas foram coletadas para caracterização qualitativa de lipídeos neutros, via cromatografia gasosa (GC-FID). Quando expressas em leveduras mutantes, incapazes de produzir triglicerídeos, tanto DAcTA quanto DGAT3 foram capazes de complementar parcialmente a síntese de TAGs, demonstrando sua atividade bioquímica na síntese de lipídeos. A análise qualitativa por espectrometria de massas destes TAGs produzidos nas leveduras possibilitará uma melhor caracterização do papel destas enzimas

no metabolismo lipídico. Este trabalho visou contribuir com o entendimento da síntese do óleo em mamona,

Palavras chave: óleos vegetais; biocombustíveis; expressão gênica; complementação de mutantes; genômica funcional.

Abstract

Triacylglycerides (TAGs) are the main seed storage lipids in plants. The chemical properties of TAGs rely on their fatty acid composition. Diacylglycerol Acyltransferases (DGATs) are the main enzymes for TAG biosynthesis as they catalyze the condensation of diacylglycerol (DAG) to fatty acids for the formation of TAGs. Different types of DGAT genes (named as DGAT1, DGAT2, DGAT3 and DAcT) have been identified in plants. DGAT1 and DGAT2 are well characterized, but little is known about DGAT3 and DAcT in most plant species. The understanding of enzymatic steps for TAG biosynthesis and their transcriptional regulation in plants is important to help to improve the content and the composition of nutritional and industrial oils. The castor bean (*Ricinus communis*) oil contains high levels of ricinoleic acid, a “not usual” fatty acid with unique characteristics that make it interesting for industry purposes. The aim of this work was to characterize the DGAT3 and DAcT genes in castor bean. This work identified four different DAcT homologs (DAcTA, DAcTB, DAcTC and DAcTD) and one DGAT3 homolog in castor bean. The pattern of expression of castor bean DGAT3 and DAcTA were characterized by RT-qPCR over 5 different seed development stages, where it was verified that DGAT3 is actively expressed; however, it was not possible to detect significant DAcT expression throughout castor bean seed development. Via transient expression in protoplasts from *Arabidopsis thaliana* leaves, the fusion proteins DAGT3-YFP and DAcTA-YFP were analyzed by confocal microscopy to assess their subcellular localization. DAcTA seems to behave as the other DGATs, associated to the endoplasmic reticulum membranes; yet, DGAT3 seems to localize in a different manner of the other DGATs, which was confirmed as cytoplasmic. Transgenic *A. thaliana* lines expressing RcDGAT3-CFP were obtained. Homozygous T3 seeds of these plants were harvested and their neutral lipids qualitatively characterized through gas chromatography (GC-FID). When expressed in mutant yeasts that are unable to produce TAGs, both DAcT and DGAT3 were able to partially rescue the TAG synthesis, displaying their biochemical activity on lipids synthesis. The qualitative analysis, through mass spectrometry, of the TAGs produced by the yeasts will enable a better characterization of the role of these enzymes on lipid metabolism. This work aimed to contribute to the understanding of the oil biosynthesis in castor bean.

Keywords: plant oils; biofuels; gene expression; mutant rescue; functional genomics.

Lista de Figuras

Figura 1 Ácidos graxos usuais e “não usuais”.....	14
Figura 2 Biossíntese de triglicerídeos (TAGs).	16
Figura 3 Mapa do Plasmídeo pVT-U.....	22
Figura 4 Mapa do plasmídeo pART7gatewayYFP:HA.....	23
Figura 5 Mapa do vetor binário pH7CWG2.....	25
Figura 6 Estrutura genômica de DAcTs e DGAT3 de mamona.....	29
Figura 7 Perfil de expressão do mRNA da RcDGAT3 em sementes em desenvolvimento de mamona.	30
Figura 8 Cromatografia em camada delgada dos extratos lipídicos totais de leveduras selvagens (WT) ou mutantes (H1246) para a síntese de triglicerídeos.	31
Figura 9 Detecção de lipídeos neutros utilizando <i>Nile red</i> em leveduras mutantes da linhagem H1246 expressando RcDGATs..	32
Figura 10 Células de levedura H1246 expressando DGAT1, DGAT3, ou DAcTA de mamona após o ensaio de <i>Nile red</i>	33
Figura 11 Predição de domínios transmembranas para DGAT3 e DAcTA de mamona.....	34
Figura 12 Protoplastos de mesófilo de <i>Arabidopsis</i> expressando transientemente GFP sozinha, RcDGAT3-YFP ou RcDAcTA-YFP co-expressas com RNTLB13-RFP.	35
Figura 13 Confirmação por PCR da inserção da construção 35S::RcDGAT3-CFP em plantas de <i>A. thaliana</i>	36
Figura 14 Imagens de microscopia de fluorescência confocal de diferentes tecidos de <i>A. thaliana</i> expressando RcDGAT3-CFP.	36
Figura 15 RT-qPCR mostrando a expressão relativa de RcDGAT3-CFP em diferentes linhagens T3 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
Figura 16 <i>Western blot</i> , hibridizado com um anticorpo específico para GFP, do extrato proteico das linhagens de <i>A. thaliana</i> expressando RcDGAT3-CFP.	38
Figura 17 Perfil de ácidos graxos em sementes de <i>A. thaliana</i> do tipo selvagem (WT) e de linhagens expressando RcDGAT3-CFP (T3-6).....	39
Figura 18 Perfil quantitativo de ácidos graxos em sementes de <i>A. thaliana</i> expressando RcDGAT3-CFP.	40

Lista de Tabelas

Tabela 1 Primers utilizados para RT-qPCR	21
Tabela 2 Primers utilizados para clonagens	22
Tabela 3. Genes homólogos à EaDAcT e à AhDGAT3 identificados em mamona.	28

Lista de Abreviaturas e Siglas

TAG	Triglicerídeo
FA	Ácido graxo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa
DGAT	Diacilglicerol aciltransferase
DAcT	Diacilglicerol acetiltransferase
AA	Aminoácidos
DAG	1,2-diacilglicerol
acTAG	3-acetil-1,2-diacilglicerol
FAME	Éster metílico de ácido graxo (<i>Fatty acid methyl ester</i>)
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
GFP	Proteína fluorescente verde
RFP	Proteína fluorescente vermelha
YFP	Proteína fluorescente amarela
CFP	Proteína fluorescente ciana
WT	Tipo selvagem (<i>Wild type</i>)
ACP	Proteína carreadora de acila (<i>Acyl carrier protein</i>)
LPA	Ácido lisofosfatídico
T-DNA	<i>Transferred DNA</i>
pb	Pares de base
CoA	Coenzima A
RE	Retículo endoplasmático
RTNLB13	<i>Reticulon-like protein B13</i>

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Óleo vegetal	13
1.1.1 Óleo de mamona.....	15
1.2 Biossíntese de Triglicerídeos em plantas	15
1.2.1 Enzimas do tipo Diacilglicerol Aciltransferase (DGAT)	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Identificação dos genes codificantes das enzimas diacilglicerol acetiltransferases (DAcT) e diacilglicerol aciltransferase solúvel (DGAT3) em mamona	20
3.2 Expressão de genes durante o desenvolvimento da semente de mamona	20
3.3 Clonagem dos genes.....	21
3.4 Estudo da localização subcelular das enzimas DGAT3 e DAcT de mamona	23
3.5 Teste de complementação em leveduras	24
3.6 Teste <i>in vivo</i> usando <i>Nile red</i>	24
3.7 Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
3.8 Expressão de RcDGAT3-CFP em <i>A. thaliana</i>	26
3.9 Análise do óleo de sementes de <i>A. thaliana</i> expressando DGAT3-CFP.....	26
4 RESULTADOS	28
4.1 O genoma de mamona possui sequências codificadoras putativas para DGAT3 e DAcT	28
4.2 RcDGAT3 é expressa durante o desenvolvimento da semente de mamona	29
4.3 RcDGAT3 e RcDAcTA complementam mutantes de leveduras incapazes de sintetizar TAGs.....	30
4.4 Os triglicerídeos produzidos pela superexpressão de RcDGAT3 ou RcDAcTA em leveduras não são detectados com o corante fluorescente específico <i>Nile red</i>	31
4.5 RcDAcTA localiza-se no retículo endoplasmático	33
4.6 RcDGAT3-CFP localiza-se no citoplasma de células em diferentes tecidos de <i>A. thaliana</i>	35
4.7 Caracterização de <i>A. thaliana</i> que superexpressam RcDGAT3-CFP	37
4.8 Sementes T3 de <i>A. thaliana</i> superexpressando RcDGAT3-CFP têm perfil de ácidos graxos similar aos de sementes selvagens (WT).....	38
5 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS	41

6 REFERÊNCIAS 45

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia tem como uma de suas finalidades trazer qualidade de vida para a população e contribuir com ações menos nocivas ao meio ambiente. Um dos importantes passos desta ampla área é o de levar maior sustentabilidade para a sociedade, participando na transição de indústrias que dependem do óleo derivado do petróleo para uma situação mais sustentável, que utiliza óleos vegetais (Dyer and Mullen, 2008).

O óleo bruto, derivado do petróleo, é composto por uma mistura de hidrocarbonetos e outros químicos que são fracionados antes de serem usados, sendo 90% deste óleo utilizado com fins de combustível, restando os outros 10% na fabricação de plásticos, lubrificantes e outros produtos da indústria petroquímica. A gasolina, um dos compostos do óleo bruto, é constituída por moléculas de 5-12 carbonos, enquanto o combustível diesel apresenta 10-15 por molécula (Durrett et al., 2008, Dyer and Mullen, 2008). Embora, economicamente a utilização do petróleo na produção de combustíveis tenha sido favorável, fontes renováveis, com menor impacto ao meio ambiente, têm sido desejadas. O biodiesel, diesel formado a partir do óleo vegetal, contém poucos compostos aromáticos ou com enxofre, o que reduz a formação de óxido sulfúrico, ácido sulfúrico e outros compostos que possam ser considerados carcinogênicos, além de aumentar a lubricidade do combustível (Durrett et al., 2008). O biodiesel também apresenta baixa produção e emissão de monóxido de carbono (CO), e sua emissão pode ser considerada neutra em relação à produção de CO₂, já que as plantas capturam a energia solar, via fotossíntese, e convertem água e CO₂ em açúcares e triglicerídeos (TAGs), podendo diminuir a emissão de gases do efeito estufa em até 41% (Hill et al., 2006).

1.1 Óleo vegetal

Óleos vegetais são quimicamente parecidos com óleos de cadeias longas provenientes do óleo bruto (petróleo) e, portanto, podem ser utilizados como biodiesel (Dyer and Mullen, 2008). O óleo vegetal é formado por uma molécula de glicerol ligada a três ácidos graxos (FAs), que dão a origem à uma molécula de triacilglicerol, ou triglicerídeo (TAG). TAGs vegetais são principalmente constituídos por uma mistura de ácidos graxos de 16 ou 18 carbonos, tanto nas formas saturadas ou insaturadas. Os principais FAs encontrados em óleos vegetais são o ácido

palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1 Δ^9), ácido linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$) e o ácido linolênico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$) (Jaworski and Cahoon, 2003); entretanto, diversos ácidos graxos nomeados como não usuais têm sido encontrados em espécies com baixo valor agrônômico (Figura 1). Esses lipídeos são distinguidos devido ao número de carbonos, número de insaturações e grupamentos funcionais em suas moléculas. Como o aumento no número de carbonos acaba levando à uma maior viscosidade das moléculas, TAGs são transesterificados em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs) na indústria para que possam ser usados como combustíveis. A viscosidade dessas moléculas está relacionada ao quanto elas podem ser queimadas (qualidade de combustão), e ao acúmulo de carbono nos bicos de injetores e anéis de pistões em motores de combustão. De forma geral, quanto mais saturado o ácido graxo, melhor a combustão; porém, FAs saturados apresentam maior viscosidade e propensão ao entupimento de injetores (Beltrão e Oliveira, 2008). Embora não exista um perfil de ácidos graxo ideal, atualmente é buscado um biocombustível com alto índice de FAs mono-insaturados (Durrett et al., 2008).

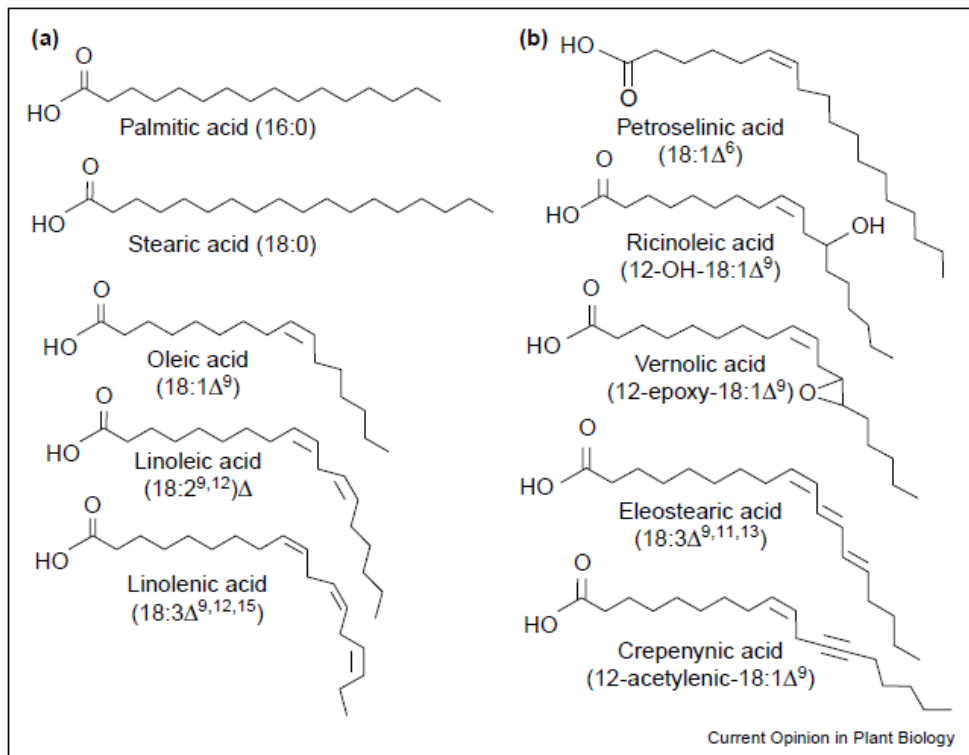


Figura 1 Ácidos graxos usuais e “não usuais”. (A) Ácidos graxos usuais são encontrados na maioria das espécies oleaginosas. (B) Ácidos graxos são ditos como “não usuais”, pois são encontrados em sementes de poucas espécies de plantas. O ácido ricinoléico (*Ricinoleic acid*) é o principal ácido graxo encontrado nas sementes de mamona (Adaptado de Jaworski and Cahoon, 2003).

Oleaginosas como a soja (*Glycine max*), dendê (*Elaeis guineenses*), canola (*Brassica napus*) e mamona (*Ricinus communis*) têm sido cultivadas no Brasil (Beltrão e Oliveira, 2008). Entre elas, a soja é principal fonte de biodiesel no Brasil, embora parte significativa de sua produção seja direcionada para a indústria de alimentos (Rogalski and Carrer, 2011). Esta planta apresenta níveis variados na composição de FAs usuais insaturados em seus triglicerídeos, causando instabilidade na qualidade/pureza de seu óleo. Metodologias vêm sendo estudadas para aumentar os níveis de pureza de ácidos graxos em TAGs, assim como modificações genéticas para a expressão de ácidos graxos não usuais em cultivares comercialmente exploradas (Buhr et al., 2002, Bungal et al., 2008).

1.1.1 Óleo de mamona

A mamona é uma planta perene cultivada na China, Índia e Brasil, países cujo clima é tropical ou subtropical. A semente desta oleaginosa é conhecida pelas suas proteínas tóxicas e também pela abundância de óleo. Sessenta por cento do peso seco da semente de mamona é em óleo, sendo que 90% dos triglicerídeos são formados por apenas um FA, o ácido ricinoléico (Figura 1). Este ácido graxo “não usual” tem características únicas, como conter apenas uma instauração (Δ^9) e possuir uma hidroxila ligada ao carbono 12. Esta hidroxila proporciona propriedades físico-químicas únicas ao ácido ricinoléico, tornando-o mais reativo e simplificando seu processamento para matéria prima de cosméticos, tintas, plásticos, entre outros produtos (Chen et al., 2007, Dyer and Mullen, 2008).

1.2 Biossíntese de Triglicerídeos em plantas

A síntese de ácidos graxos, em plantas, inicia-se no cloroplasto, onde moléculas de 2 carbonos (acetil-CoA), produzidas a partir do piruvato, são ativadas à malonil-CoA e então transferidas para a proteína carreadora de acila (ACP), dando origem ao complexo malonil-ACP e promovendo a síntese de ácidos graxos via o complexo acetil-CoA carboxilase (Durrett et al., 2008). Neste processo, moléculas de 2 carbonos são adicionadas até gerarem um ácido graxo de 18 carbonos, onde poderá ocorrer um passo de desaturação, por enzimas do tipo desaturases. Os

ácidos graxos, então, são dissociados das ACPs e exportados ao retículo endoplasmático, onde são esterificadas a acil-CoAs (Figura 2). A enzima glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT) inicia o processo na formação de glicerolipídeos, transferindo a cadeia acila do acil-CoA para o glicerol-3-fosfato na posição *sn*-1, formando o ácido lisofosfatídico (LPA) (Voelker and Kinney, 2001). A enzima ácido lisofosfatídico aciltransferase (LPAAT) é a responsável por adicionar o próximo grupo acila do acil-CoA na posição *sn*-2 do LPA, criando a molécula de ácido fosfatídico (PA). A formação de triglicerídeos pode ser alcançada por diversas vias, sendo as duas mais conhecidas a independente de acil-CoA (utilizando a enzima fosfolipídeo:diacilglicerol aciltransferase, PDAT), ou a dependente de acil-CoA, sendo essa última reação catalisada pela enzima diacilglicerol aciltransferase (DGAT). Para que o último ácido graxo seja inserido, o grupamento fosfato deve ser removido do ácido fosfatídico, tornando disponível a posição *sn*-3 na então molécula de 1,2-diacilglicerol (DAG). A desfosforilação é realizada pela enzima ácido fosfatídico fosfatase (PAP) (Voelker and Kinney, 2001).

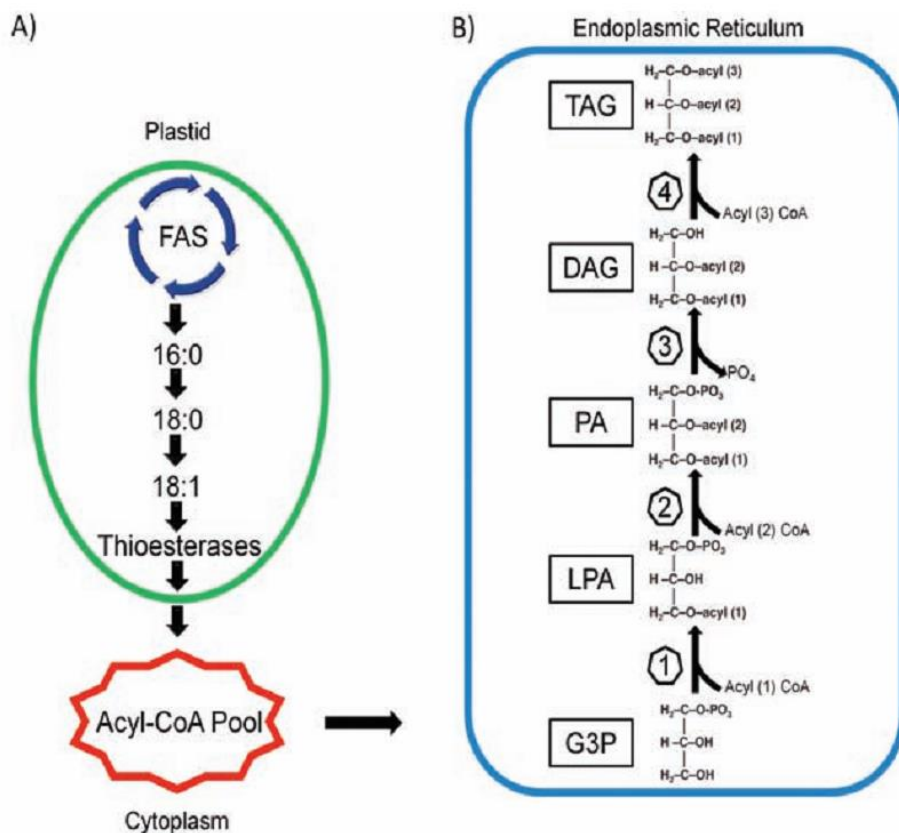


Figura 2 Biossíntese de triglicerídeos (TAGs). Ácidos graxos são formados no cloroplasto (a) e então exportados ao retículo endoplasmático (b), onde após uma série de reações, triglicerídeos são sintetizados. A enzima limitante para a síntese de TAGs é a diacilglicerol aciltransferase (DGAT) (Adaptado de Cagliari et al., 2011).

1.2.1 Enzimas do tipo Diacilglicerol Aciltransferase (DGAT)

Enzimas do tipo acil-CoA: diacilglicerol aciltransferase (EC 2.3.1.20) são enzimas que catalisam a acilação do DAG na sua terceira posição, utilizando acil-CoA como substrato. DGATs já foram encontradas em diversos organismos e têm sido exploradas pela sua capacidade de produção de triglicerídeos (óleo) (Cases et al., 2001, Peng et al., 2013, Li et al., 2010). Essas proteínas são as últimas da rota principal de síntese de TAGs (Kennedy *pathway*) e são consideradas como enzimas limitantes para a produção dos mesmos (Ichihara et al., 1988). Diversos tipos de DGATs foram encontradas em eucariotos. DGAT1 possui entre 6 a 9 domínios transmembranas, está localizada no retículo endoplasmático e é expressa em vários tecidos das plantas, inclusive nas sementes (Kroon et al., 2006); DGAT2, entretanto, possui apenas um ou dois domínios transmembrana e sua localização no retículo endoplasmático parece ser diferente da de DGAT1. Além disso, essas enzimas possuem diferenças em relação às suas atividades enzimáticas, indicando que elas têm papéis não redundantes nas células (Shockey et al., 2006). DGAT1 e DGAT2 não apresentam homologia entre suas sequências, sendo DGAT1 maior que DGAT2 e ambas possuem histórias evolutivas independentes (Turchetto-Zolet et al., 2011). A expressão de DGAT2 também parece ter papel fundamental para o acúmulo de TAGs em sementes de mamona, pois ela é maior durante todo o desenvolvimento da semente em relação à DGAT1, e é menor em outros tecidos (Cagliari et al., 2010, Chen et al., 2007). A expressão de DGAT2 de mamona em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*, que já expressavam a ácido graxo hidroxilase 12 (enzima que adiciona o grupamento hidroxila no carbono 12 do ácido oleico, formando o ácido ricinoleico), mudou o fenótipo das sementes dessas plantas, que passaram a acumular 30% de ácido ricinoléico, ao invés de apenas 17% (Burgal et al., 2008), indicando que essa enzima está relacionada ao acúmulo de ácido ricinoléico.

Em 2006, Saha e colaboradores isolaram, a partir da fração citosólica de cotilédones em desenvolvimento de amendoim (*Arachis hypogaea*), um novo tipo de diacilglicerol aciltransferase. Por possuir baixa identidade em relação à DGAT1 e estar presente em outra região da célula, esta enzima foi nomeada como DGAT solúvel, ou DGAT3 (Saha et al., 2006). Seis anos depois, Hernández e colaboradores mostram que a DGAT3 de *A. thaliana* está localizada no citoplasma, diferente da localização de AtDGAT1 (Hernández et al., 2012). Desde então, homólogos de DGAT3 têm sido descobertas em outras espécies de plantas a fim de tentar

entender sobre a possível rota alternativa ao retículo endoplasmático para a síntese de TAGs (Cao et al., 2013, Chi et al., 2014).

Durrett e colaboradores, em 2010, identificaram um novo tipo de DGAT em *Euonymus alatus*, que ao invés de adicionar uma molécula de acila à DAG, adiciona uma molécula de dois carbonos (acetil), formando 3-acetil-1,2-diacilglicerol (acTAG). Esta enzima foi denominada diacilglicerol acetiltransferase (DAcT) (Durrett et al., 2010). As propriedades físico-químicas dos acTAGs diferem dos TAGs usuais, como por exemplo, a redução de 30% em sua viscosidade. Esta característica é importante na indústria de biocombustíveis, pois acTAGs poderiam ser diretamente aplicados para a combustão, sem a necessidade do processo de transesterificação. Durrett também expressou EaDAcT, de forma heteróloga, em *A. thaliana* e observou a formação de acTAGs em 40% do óleo da semente desta planta (Durrett et al., 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar genes codificadores de diacilglicerol-acetiltransferases (DAcT) e diacilglicerol-aciltransferases solúveis (DGAT3) expressos em sementes de mamona (*Ricinus communis*), visando contribuir para a elucidação dos mecanismos que controlam o metabolismo de lipídeos, disponibilizando ferramentas biotecnológicas para a manipulação da qualidade de óleos vegetais.

2.2 Objetivos específicos

- a) Estudar a expressão dos genes identificados durante o desenvolvimento da semente;
- b) Analisar o padrão de localização subcelular destas enzimas em células de vegetais;
- c) Comprovar a funcionalidade dos genes através de um teste de complementação em leveduras incapazes de sintetizar triglicerídeos;
- d) Superexpressar os genes em *Arabidopsis thaliana* e avaliar o perfil de seus ácidos graxos qualitativamente e quantitativamente;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Identificação dos genes codificantes das enzimas diacilglicerol acetiltransferases (DAcT) e diacilglicerol aciltransferase solúvel (DGAT3) em mamona

Com a finalidade de identificar possíveis genes codificantes para DAcT e DGAT3 em mamona, uma busca sistemática foi realizada no banco genômico da mamona (<http://castorbean.tigr.org/>), utilizando o gene EaDAcT de *Euonymus alatus* (GenBank: GU594061), e o gene AhDGAT3 (GenBank; AAX62735), de amendoim (*Arachis hypogaea*), como iscas. A busca dos genes putativos foi realizada pelo software BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), na configuração tBLASTx. Foram selecionadas sequências que possuíam um *E-value* menor que 10^{-50} , pois havia sequências acima desse ponto de corte. Posteriormente, sequências previamente caracterizadas e presentes no banco de dados de *Arabidopsis thaliana* (<https://www.arabidopsis.org/>) e *Phytozome* (<http://www.phytozome.net/>) serviram como parâmetro de comparação para a identificação dos genes codificantes para DAcT e DGAT3 em mamona.

3.2 Expressão de genes durante o desenvolvimento da semente de mamona

O cDNA de sementes de mamona da variedade comercial AL-Guarani, gentilmente cedido por Cagliari (Cagliari et al., 2010), foi utilizado para a análise da expressão gênica em cinco diferentes estágios de desenvolvimento. Cada estágio é baseado em características morfológicas das sementes, como cor, textura e tamanho, segundo Cagliari et al. (2010).

Oligonucleotídeos sintéticos já projetados (Tabela 1) com o auxílio do programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html) foram utilizados para as reações de PCR em tempo real (qPCR), utilizando a expressão dos genes constitutivos ubiquitina (RcUBI) e fator de alongação 1-alfa (RcEF1 α) como normalizadores. RT-qPCR foi realizado com o passo inicial de 5 min a 94°C, seguido por 40 ciclos com 10 seg a 94°C, 15 seg a 60°C e 15 seg a 72°C. O perfil da curva de *melting* dos produtos de PCR foi obtido depois da incubação a 40°C por 2 min para reanelamento, seguido por um aquecimento de 55°C até 99°C. A diluição de cDNA utilizada foi de 1:50, sendo adicionado 12.5 μ L de cDNA por reação. O teste estatístico ANOVA seguido do teste de Dunnett foi utilizado, comparando todos os estágios com o controle (primeiro estágio).

Tabela 1 Primers utilizados para RT-qPCR .

Nome	Sequência	Tamanho do Amplicon
Rco_DAcTaf Rco_DAcTAr	5'-CGGGTTTGATGCATGAGATT-3' 5'-TGAGGGAAAAACAGCCAAAC-3'	214
Rco_DAcTBf Rco_DAcTBr	5'-GTGAAGGGCAGATGGAGGT-3' 5'-CCATGAGGTTCCATCTTCTACC-3'	202
Rco_DAcTCf Rco_DAcTCr	5'-CGTGGGAAATCACTTGGTTC-3' 5'-GACGGAAAGAAGAGCCAAAA-3'	163
Rco_DAcTdf Rco_DAcTDr	5'-ATTCCTGACCATTGGATTTCG-3' 5'-TCCAGAAGCCCGTTACAGTT-3'	152
Rco_DGAT3f Rco_DGAT3r	5'-CCTTGTCTGAGGACTTTTCCA-3' 5'-TCTCCTTTGCTCGCAATTCT-3'	126
Rco_UBIf Rco_UBIr	5'-ATCGATCGAATCAAGGAACG-3' 5'-CACCCCTCAATGTTGTAGTCACG-3'	
Rco_EF1af Rco_EF1ar	Não disponível	
At_UBQ10f At_UBQ10r	5'-GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAAG-3' 5'-ACTATGTTTCCGTTCCCTGTTATCTCTTT-3'	
At_PP2Af At_PP2Ar	5'-TAACGTGGCCAAAATGATGC-3' 5'-ACCAAGCGGTTGTGGAGAAC-3'	

As reações foram feitas em triplicatas técnicas, incluindo os genes normalizadores e os controles negativos (reações sem cDNA), em placas de 96 poços. A fluorescência do *SYBR-Green* foi analisada pelo programa StepOne (Applied Biosystems), na versão 2.1, e o valor do *Cycle Threshold* (CT) de cada amostra foi calculado e reportado usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

3.3 Clonagem dos genes

cDNAs completos dos genes RcDGAT3 (XM_002519293) e RcDAcTA (XM_002528977) foram amplificados a partir de cDNA de folhas de mamona, utilizando *primers* específicos (Tabela 2, Rc_DGAT3 e Rc_DAcTA) que continham o códon de término (STOP) ou não. Os cDNAs foram clonados em vetores pENTR/D-TOPO com a finalidade de gerar clones de entrada para o sistema *Gateway* (Invitrogen). As sequências correspondentes aos genes foram confirmadas via sequenciamento. Para expressão em *Saccharomyces cerevisiae* os

cDNAs completos dos genes codificadores de RcDacTA e RcDGAT3 contendo o *stop-codon* foram subclonados a partir de pENTR-D para o plasmídeo pVT103-U (Vernet et al, 1987; Figura 3) utilizando-se os sítios de BamHI e XbaI que foram inseridos nos *primers* utilizados para o isolamento dos genes. Por expressar o gene URA3, o plasmídeo permite o crescimento em meio sem uracila em leveduras auxotróficas para este nutriente. Construções para RcDGAT1 foram gentilmente cedidas por Turchetto-Zolet et al. (2011).

Tabela 2 Primers utilizados para clonagens

Nome	Sequência
Rc_DGAT3_TOPOf	5'-CACCATGGAAGTCTCAGGCCTG-3'
Rc_DGAT3_STOPr	5'-TTAAGATGCAGGGGCCAGACC-3'
Rc_DGAT3_BHIf	5'-CACCGGATCCATGGAAGTCTCAGGC-3'
Rc_DGAT3_noStop_XbaIr	5'-GGTCTAGAGATGCAGGGGCCAGACCCAA-3'
Rc_DAcTA_BHIf	5'-CACCGGATCCATGGAAGGAGAGTTCAAGAA-3'
Rc_DAcTA_noStop_XbaIr	5'-GGTCTAGACTTTGTATTCCATTGAAGA-3'
Rc_DAcTA_XbaIr	5'-GGTCTAGATTATTGTATTCCATTGAAGA-3'

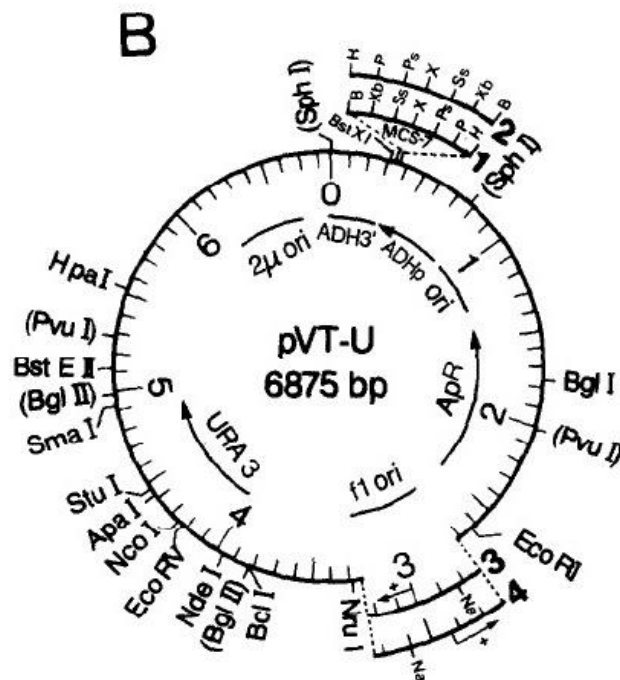


Figura 3 Mapa do Plasmídeo pVT-U. URA3: gene relacionado a síntese de uracila (codifica a orotidina 5'-fosfato descarboxilase); 2 μ ori: origem de replicação em levedura; ADH3' e ADH3: Promotor e região 3' da álcool desidrogenase; Ori: origem de replicação em bactéria; f1 ori: origem de replicação em fago; ApR: gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina (Vernet et al., 1987).

3.4 Estudo da localização subcelular das enzimas DGAT3 e DAcT de mamona

A sequência codificadora dos genes RcDGAT3 e RcDacTA sem seus *stop-codons* foram utilizados para criação de fusões traducionais com a proteína de fluorescência amarela (*yellow fluorescent protein* – YFP), obtidos através de clonagem *Gateway* (Invitrogen) no plasmídeo de expressão pART7gatewayYFP:HA (Figura 4). Plasmídeos contendo a proteína de retículo endoplasmático (*reticulon-like protein* B13 - RTNLB13), fusionada a proteína de fluorescência vermelha (*red fluorescent protein* – RFP) foram co-transformados para a identificação do retículo (Sparkes et al., 2010). Protoplastos provenientes do mesófilo de *Arabidopsis thaliana* foram obtidos através da técnica *Tape-Arabidopsis Sandwich* (Wu et al., 2009) e a transformação realizada de acordo com Sheen (2002). A expressão transiente da fluorescência da YFP nos protoplastos foi visualizada por microscopia de fluorescência confocal, no Centro de Microscopia da UFRGS (<http://www.cme.ufrgs.br/>) no equipamento Olympus FV1000.

A sequência primária das proteínas codificadas pelos genes RcDGAT3 e RcDacTA foram utilizadas para a análise de domínios transmembrana putativos através do servidor TMHMM-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

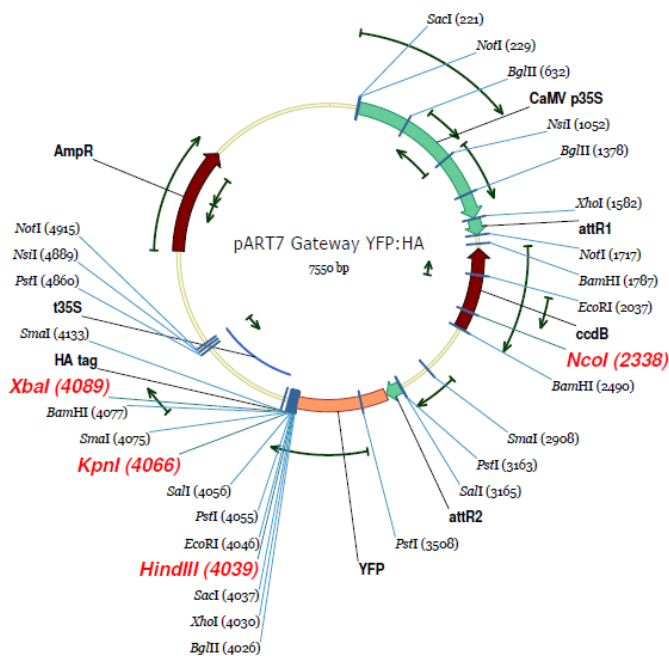


Figura 4 Mapa do plasmídeo pART7gatewayYFP:HA. attR1 e attR2: sequências que permitem a recombinação específica do gene de interesse com o plasmídeo de entrada; AmpR: gene de resistência ao antibiótico ampicilina; CaMV p35S e t35S: promotor e terminador 35S; ccdB: gene que codifica a proteína *control of cell death B* ; YFP: sequência codificadora para YFP; HA: sequência codificadora para o peptídeo de hemaglutinina.

3.5 Teste de complementação em leveduras

Leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) mutantes da linhagem H1246, incapazes de sintetizar triglicerídeos devido a mutações nos genes ARE1/ARE2/LRO1/DGA1 (genes que codificam DGAT-like nesta espécie) (Sandager et al., 2002), e transformadas como descrito por Turchetto-Zolet et al. (2011) com o vetor pVT103-U (Vernet et al., 1987) (Figura 3) contendo as sequências codificadoras para DGAT3, DAcTA, ou DGAT1 (controle positivo) de mamona, foram utilizadas para testar a complementação de fenótipo. Leveduras foram crescidas até sua fase logarítmica (24 horas), ou até sua fase estacionária (72 horas) a 30°C em meio de cultura em meio mínimo contendo 0,67% de *Yeast Nitrogen Base*, 2% de glicose, e drop out de aminoácidos sem uracila. Células foram coletadas por centrifugação, lavadas e ressuspensas em 1mL de 0.9% (w/v) de cloreto de sódio (NaCl). Células foram homogeneizadas com um volume igual de *beads* de vidro (0.5 mm), com vortex intenso por 5 min. Lipídeos foram extraídos com uma solução clorofórmio/metanol/0.9% NaCl em água (2: 1: 1 v/v/v). A fase orgânica foi coletada, secada e ressuspensa em 20 µL de clorofórmio. Os lipídeos extraídos foram aplicados em placas de sílica gel para cromatografia de camada delgada (Pan et al., 2013), utilizando como fase móvel uma solução de hexano/éter dietílico/ácido acético (90:10:1 v/v/v). As placas foram visualizadas com uma solução de 0.03% de Coomassie Blue R250 (Sigma) em 20% de metanol. Oléo de soja foi utilizado como padrão para identificar TAGs.

3.6 Teste *in vivo* usando Nile red

Leveduras foram crescidas até a fase estacionária (72 horas) e o ensaio de fluorescência de Nile red foi realizado como descrito em Siloto (Siloto et al., 2009). Após as medições de fluorescência, células foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Olympus CKX41), utilizando o filtro G de excitação verde ExBP480-550/DM570/BA590 (<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorotable3.html>).

3.7 Transformação de *Arabidopsis thaliana*

Plantas de *Arabidopsis thaliana* do ecótipo Columbia-0 (Col-0), foram crescidas e transformadas por inoculação com *Agrobacterium tumefaciens* utilizando o método *floral-dip* Zhang et al. (2006). O vetor binário pH7CWG2 (Karimi et al., 2005, Figura 5), contendo a

sequência codificadora de RcDGAT3 fusionada à proteína de fluorescência ciana (*cyan fluorescent protein* – CFP), obtido por meio da metodologia *Gateway* (Invitrogen), foi utilizado para expressão deste gene em *Arabidopsis*. Plantas T1 foram selecionadas em meio contendo higromicina (25mg/L), carbenicilina (500mg/L) e nistatina (50mg/L). A seleção das linhagens foi realizada observando-se a segregação da resistência ao antibiótico higromicina nas plantas T2. Plantas homozigotas para o T-DNA foram selecionadas na geração T3. DNA das plantas foi extraído pelo método CTAB e PCR para a identificação de transformantes foi realizado utilizando os *primers* da tabela 1. O programa da PCR contém um passo inicial de 5 min a 94°C, seguido por 35 ciclos com 60 seg a 94°C, 45 seg a 55°C e 45 seg a 72°C, e um passo para a extensão final de 7 min a 72°C.

Plantas T2 de *A. thaliana* expressando DGAT3-CFP foram visualizadas por microscopia de fluorescência confocal (Olympus FV1000).

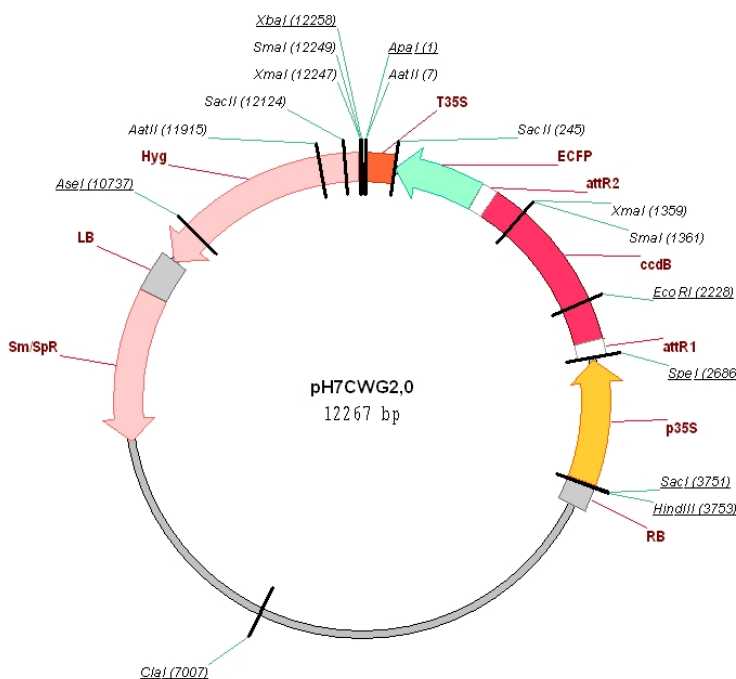


Figura 5 Mapa do vetor binário pH7CWG2. *attR1* e *attR2*: sequências que permitem a recombinação específica do gene de interesse com o plasmídeo de entrada; CaMV p35S e t35S: promotor e terminador 35S; ccdB: gene que codifica a proteína *control of cell death B*; ECFP: sequência codificadora para CFP; Sm/SpR: gene de resistência ao antibiótico espectinomicina; RB e LB: bordas direita e esquerda, respectivamente, do T-DNA; Hyg: gene de resistência à higromicina (<https://gateway.psb.ugent.be/vector/show/pH7CWG2/search/index/>).

3.8 Expressão de RcDGAT3-CFP em *A. thaliana*

RNA total de plântulas T3 de *A. thaliana* foi extraído com Trizol (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Transcrição reversa das fitas de RNA foram realizadas usando 200 unidades da transcriptase reversa M-MLV (Promega) e usando o *primer* T24V-poli-T, num volume final de 25µL de reação. Os produtos de cDNA foram diluídos 1:10 e estocados a -80°C. RT-qPCR das plântulas de *A. thaliana* foi realizado como descrito no item 3.2, utilizando como normalizadores os genes ubiquitina 10 (AtUBQ10) e a proteína-fosfatase 2 (AtPP2A) (Tabela 1).

Extratos de proteínas foram obtidos de plântulas T3 homozigotas conforme a metodologia de Daisuke Tsugama (Tsugama et al., 2011). *Western blot* foi realizado pelo método de Johan Memelink (Memelink et al., 1994) utilizando um anticorpo policlonal anti-GFP de coelho, capaz de detectar as variantes da GFP, conjugado com *horseradish peroxidase* (Santa Cruz Biotechnology, sc-8334). Os anticorpos ligados a proteínas foram detectados usando o substrato cromogênico (Novex® HRP Chromogenic Substrate). Para controle positivo, foi utilizado extrato de proteínas totais de *Nicotiana benthamiana* (linhagem16c) expressando GFP (Ruiz et al., 1998).

3.9 Análise do óleo de sementes de *A. thaliana* expressando DGAT3-CFP

Sementes de linhagens 35S:DGAT3-CFP de *A. thaliana* foram adicionadas a uma solução contendo 1 mL 5% de ácido sulfúrico (H₂SO₄) em metanol (v/v), 50 µg de hidroxitolueno butilado (BHT) e 300µL de tolueno. As amostras foram agitadas intensamente e aquecidas a 85°C por 1.5 hrs. Após, foram centrifugadas e a fase orgânica transferida para um novo tubo, onde foi evaporada utilizando nitrogênio (Li-Beisson et al., 2010). As amostras foram ressuspendidas em 500µL de hexano e 1µL foi aplicado no cromatógrafo a gás (Modelo CG 2010, Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com injetor automatizado, detector de ionização em chama usando coluna capilar de sílica fundida (SBL 100, Shimadzu, 30 m x 0.25 mm, 0.25 mm de espessura). O solvente para lavagem utilizado foi o hexano e a temperatura de injeção foi de 240°C. O gás carreador foi o hidrogênio com injeção constante de 1mL min⁻¹. A detecção foi realizada a partir do espectrofotômetro por ionização em chama (FID), em uma temperatura de 260°C com a taxa de injeção de gás de hidrogênio a 40 mL min⁻¹ e ar a 400 mL min⁻¹. A

temperatura inicial do forno foi ajustada para 50°C por 1 min e aquecida até os 250°C em um gradiente de 10°C min⁻¹. Cromatogramas foram analisados com base em suas áreas e tempos de retenção, e experimentos foram realizados em duplicatas biológicas.

4 RESULTADOS

4.1 O genoma de mamona possui seqüências codificadoras putativas para DGAT3 e DAcT

Visando um melhor entendimento de como ocorre a biossíntese de lipídeos em mamona, seqüências codificantes para DGAT3 e DAcT foram buscadas no genoma de mamona. Foi encontrado um possível gene homólogo à AhDGAT3 na oleaginosa, e 4 possíveis genes codificantes para DAcT, denominados DAcTA, DAcTB, DAcTC e DAcTD (Tabela 3, Figura 5).

Tabela 3. Genes homólogos à EaDAcT e à AhDGAT3 identificados em mamona.

Gene	Database	Acesso	AAs	Éxons	Ítrons
DGAT3	JGI - Phytozome	29889t000177	332	2	1
DAcTA	JGI - Phytozome	27613t000006	352	1	0
DAcTB	JGI - Phytozome	27613t000005	406	6	5
DAcTC	JGI - Phytozome	29812t000007	369	1	0
DAcTD	JGI - Phytozome	29990t000016	367	1	0

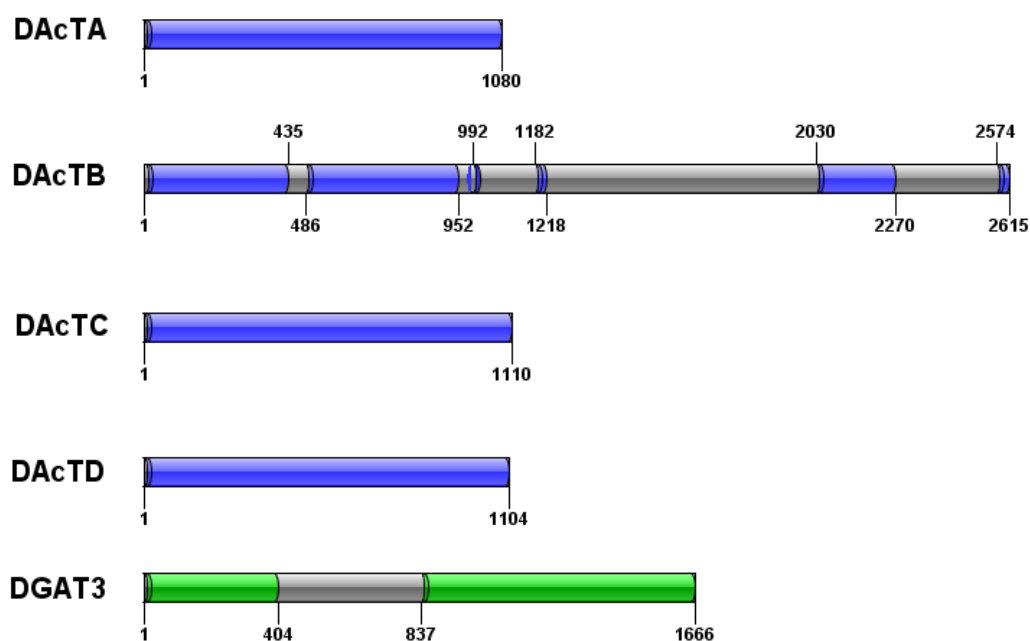


Figura 6 Estrutura genômica de DAcTs e DGAT3 de mamona. Íntrons estão representados em cinza e éxons estão representados em azul, ou verde.

4.2 RcDGAT3 é expressa durante o desenvolvimento da semente de mamona

A primeira etapa experimental do presente trabalho foi verificar se os genes putativos para RcDGAT3, RcDAcTA, RcDAcTB, RcDAcTC e RcDAcTD eram expressos durante o desenvolvimento da semente de mamona, onde TAGs são acumulados. Para esta finalidade, RT-qPCR foi realizado com cDNAs de cinco estágios do desenvolvimento (denominados S1, S2, S3, S4 e S5 de acordo com Cagliari et al. 2010) da semente da oleaginosa; entretanto, não foi detectada expressão significativa de nenhum gene codificante para RcDAcT (dado não mostrado). Para dar continuidade na caracterização funcional das DAcTs de mamona, DAcTA foi selecionada pois possui maior similaridade com a sequência de *Euonymus alatus*.

Quando analisamos a expressão de RcDGAT3 observamos que há expressão durante todo o desenvolvimento da semente, com expressão máxima no estágio S2, que representa a expansão total da semente e alta mobilização de carbono para síntese de triglicerídeos, sendo este estágio significativamente mais expresso que o S1 (Figura 7).

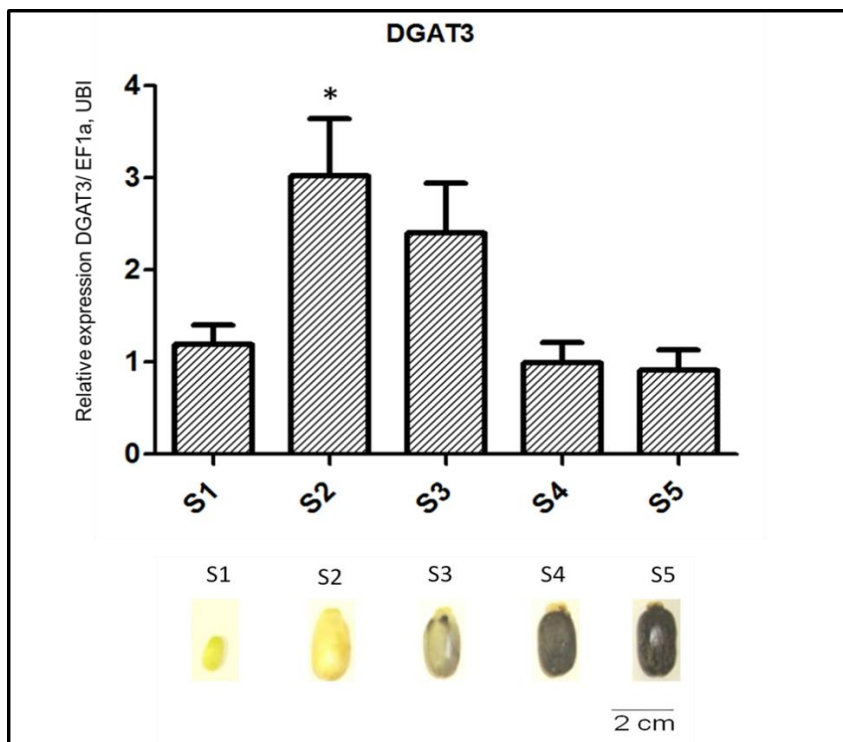


Figura 7 Perfil de expressão do mRNA da RcDGAT3 em sementes em desenvolvimento de mamona. Expressão relativa média referente ao estágio S1 e aos genes de referência RcUBI e RcEF1a. Barras representam valores de erro padrão e o asterisco indica $P < 0,05$ pelo teste ANOVA seguido de Dunnett. Abaixo estão ilustrados os estágios de desenvolvimento analisados.

4.3 RcDGAT3 e RcDacTA complementam mutantes de leveduras incapazes de sintetizar TAGs

Diacilglicerol aciltransferases podem ser consideradas enzimas limitantes para a produção de TAGs, já que são as últimas enzimas da rota principal de síntese de triglicerídeos. Para compreender melhor sobre a função dos genes putativos RcDGAT3 e RcDacTA, um teste de complementação de fenótipo foi realizado (Figura 8). Leveduras capazes de produzir ácidos graxos, mas não triglicerídeos, foram transformadas com vetores que superexpressam a sequência codificadora para as RcDGATs e crescidas até sua fase estacionária, onde, possivelmente, triglicerídeos seriam sintetizados. Após 24 horas de crescimento, poucos TAGs foram detectados nas leveduras mutantes contendo os genes para RcDGATs (Figura 8); entretanto, bandas correspondentes a TAGs foram observadas em leveduras que foram crescidas por 72 horas, mostrando que RcDGAT3 e RcDacTA podem recuperar parcialmente o fenótipo de leveduras mutantes para a síntese de triglicerídeos (Figura 8) e provavelmente possuem a atividade de diacilglicerol aciltransferase.

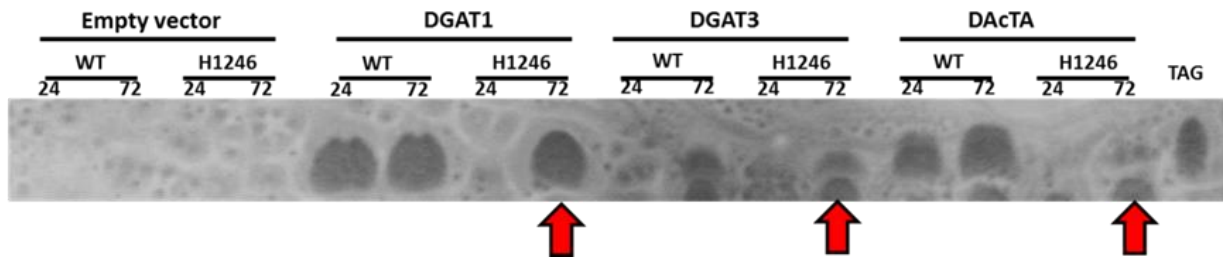


Figura 8 Cromatografia em camada delgada dos extratos lipídicos totais de leveduras selvagens (WT) ou mutantes (H1246) para a síntese de triglicerídeos. As células foram transformadas com o plasmídeo pVT103-U vazio (Empty vector) ou com o plasmídeos contendo os genes RcDGAT1, RcDGAT3 e RcDAcTA, e crescidas em meio mínimo sem uracila durante 24h (24) ou 72h (72). A região da migração correspondente aos triglicerídeos é mostrada para todas as amostras e óleo de soja foi utilizado como padrão de migração (TAG). As setas indicam as amostras onde se visualiza a complementação da síntese de TAG no mutante H1246.

4.4 Os triglicerídeos produzidos pela superexpressão de RcDGAT3 ou RcDAcTA em leveduras não são detectados com o corante fluorescente específico *Nile red*

Para entender melhor o efeito que RcDAcTA e RcDGAT3 nas leveduras H1246, mutantes para a síntese de TAGs, a quantificação dos lipídeos neutros produzidos nestas leveduras foi realizada pelo método da fluorescência de *Nile red* (Siloto et al., 2009). Este método tem sido aplicado para a quantificação de lipídeos neutros e está correlacionado com a atividade enzimática de DGATs. Por este método, não foi possível identificar diferenças quantitativas em relação aos lipídeos neutros entre leveduras mutantes H1246 carregando o vetor vazio, RcDGAT3 ou DAcTA (Figura 9).

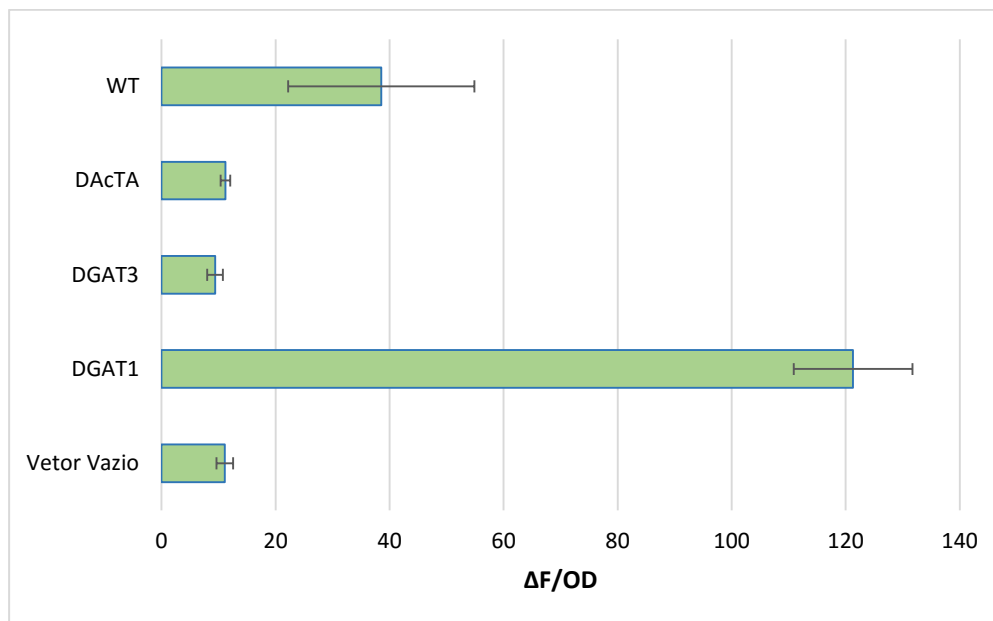


Figura 9 Detecção de lipídeos neutros utilizando *Nile red* em leveduras mutantes da linhagem H1246 expressando RcDGATs. Os valores foram calculados dividindo a fluorescência do *Nile red* pela densidade óptica (OD) a 600 nm, e representam os níveis de lipídeos neutros acumulados pelas leveduras recombinantes. Barras representam o desvio padrão.

Após as medições de fluorescência em fluorímetro, as leveduras foram observadas com microscópio de fluorescência. Embora diferenças em relação à produção de lipídeos neutros não tenham sido detectadas por este método, as leveduras testadas apresentam clara diferença de fluorescência quando observadas pelo microscópio (Figura 10). Isso é devido ao filtro de emissão diferente do qual foi utilizado do experimento anterior, sendo neste último possível apenas observar os lipídeos polares, ou fosfolipídeos.

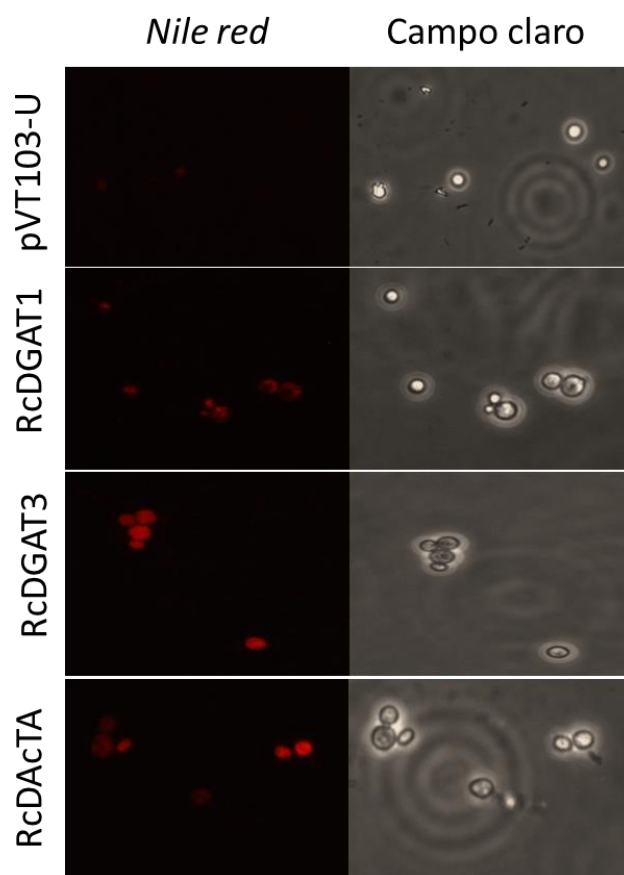


Figura 10 Células de levedura H1246 expressando DGAT1, DGAT3, ou DAcTA de mamona após o ensaio de *Nile red*. Leveduras com o plasmídeo vazio (pVT103-U) foram utilizadas como controle. O espectro de excitação utilizado para fluorescência foi o mesmo da GFP. Imagens à esquerda mostram a fluorescência por *Nile red*, e imagens à direita mostram o campo claro.

4.5 RcDAcTA localiza-se no retículo endoplasmático

Para elucidar a localização subcelular das proteínas codificadas pelos genes putativos RcDGAT3 e RcDAcT, inicialmente utilizamos o software TMHMM versão 2.0 para prever possíveis domínios transmembrana. O algoritmo não predisse nenhum domínio transmembrana para a RcDGAT3; entretanto, foram detectados 8 possíveis domínios para DAcTA (Figura 11). Para verificar a localização subcelular dessas enzimas, ensaios de expressão transiente em protoplastos provenientes do mesófilo de *A. thaliana* foi realizado. Foram utilizadas fusões tradicionais do gene da proteína amarela fluorescente (YFP), enquanto que a GFP foi utilizada como controle de localização citoplasmática. É sabido que enzimas do tipo diacilglicerol aciltransferases estão usualmente presentes nas membranas do retículo endoplasmático das células. Então, para uma melhor resolução sobre a localização subcelular das enzimas putativas,

foi utilizada como comparação uma proteína que se localiza no retículo (RNTLB13, Tolley et al., 2008), fusionada a proteína vermelha fluorescente (RFP). Quando as imagens correspondentes a fluorescência da GFP/YFP são sobrepostas com aquelas que correspondem com a fluorescência da RFP, é possível identificar se as proteínas se co-localizam (Figura 12). RcDacTA está localizada nas membranas do retículo endoplasmático como as DGATs convencionais (Shockey et al., 2006); porém, não há sobreposição entre RcDGAT3 e RNTLB13-RFP, mostrando que esta proteína não se localiza nas membranas do retículo endoplasmático (Figura 12).

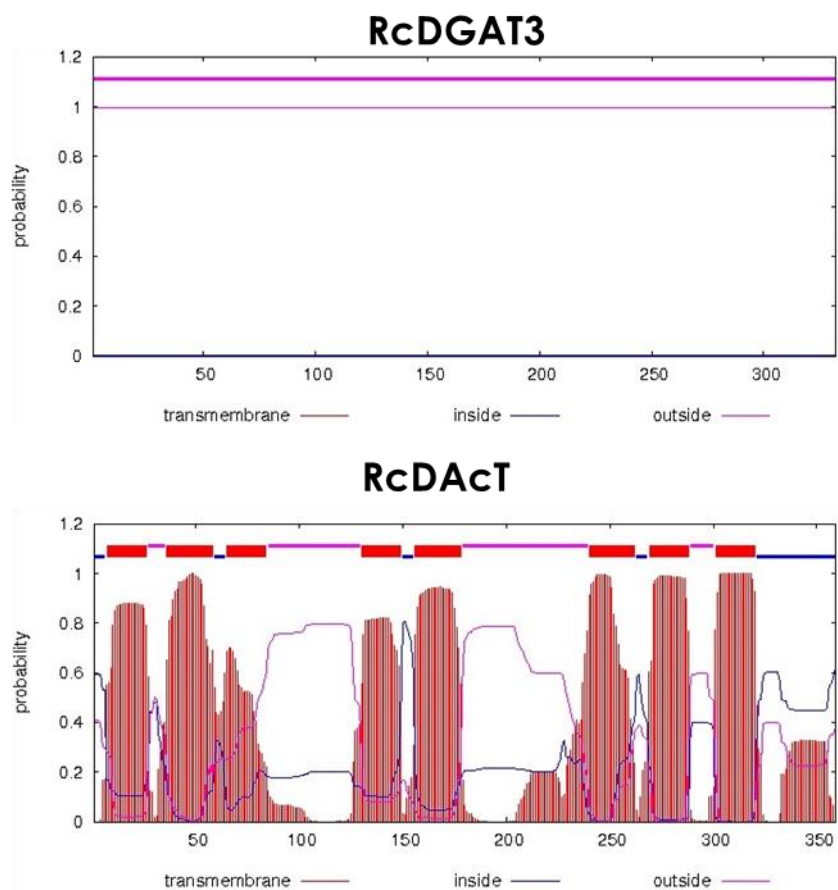


Figura 11 Predição de domínios transmembranas para DGAT3 e DAcTA de mamona. O servidor TMHMM plota a probabilidade da sequência de aminoácidos formarem uma helix transmembrana (0 - 1.0 no eixo y). Aminoácidos relevantes das sequências são mostrados em vermelho. Nenhum domínio transmembrana foi identificado para RcDGAT3, mas 8 foram identificados para RcDacTA.

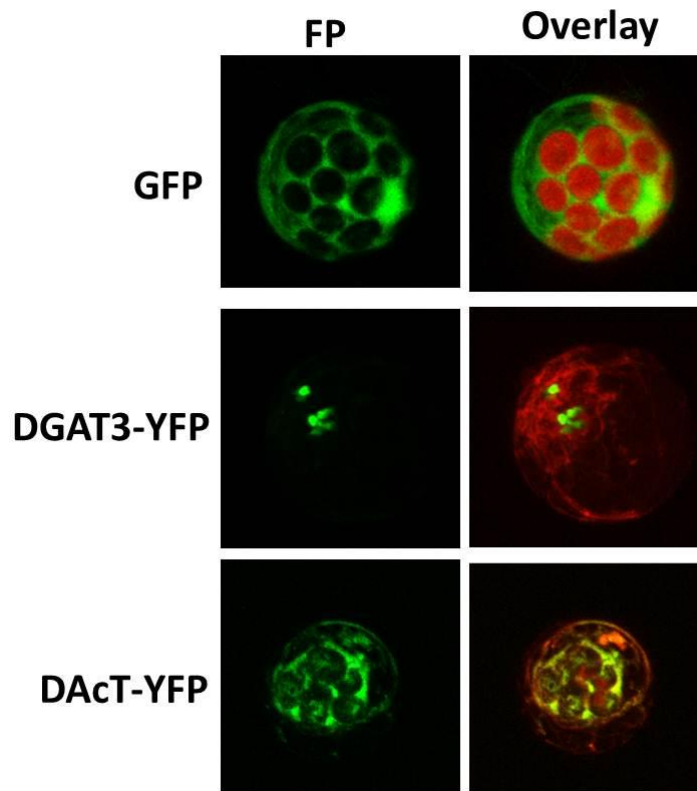


Figura 12 Protoplastos de mesófilo de *Arabidopsis* expressando transientemente GFP sozinha, RcDGAT3-YFP ou RcDAcTA-YFP co-expressas com RNTLB13-RFP. O painel da esquerda mostra as imagens da fluorescência da GFP ou YFP (FP), enquanto o da direita mostra a sobreposição da fluorescência vermelha dos cloroplastos na primeira linha (GFP) e da proteína marcadora do RE RNTLB13-RFP (Overlay).

4.6 RcDGAT3-CFP localiza-se no citoplasma de células em diferentes tecidos de *A. thaliana*

Para elucidar a localização subcelular da RcDGAT3 e avaliar o seu efeito quando expressa *in planta*, *Arabidopsis thaliana*, do ecótipo Columbia-0, foi transformada com a construção 35S::RcDGAT3-CFP via *floral-dip*. A partir desta transformação, 10 linhagens independentes resistentes ao antibiótico higromicina foram obtidas e a inserção do transgene foi confirmada por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para RcDGAT3 (Figura 13).

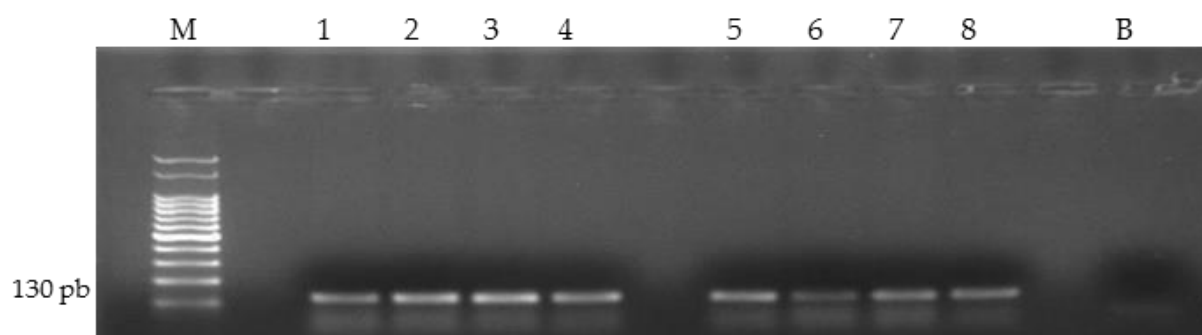


Figura 13 Confirmação por PCR da inserção da construção 35S::RcDGAT3-CFP em plantas de *A. thaliana*. M: marcador de tamanho do DNA; 1-8: transformantes; B: Controle negativo da PCR sem DNA molde. A banda amplificada corresponde a um fragmento de 130 pb específica do T-DNA.

Plantas de *A. thaliana* RcDGAT3-CFP, da geração T2, foram utilizadas para a análise da localização subcelular da proteína de fusão por microscopia confocal. Diferentes tecidos dessas plantas apresentam a localização de RcDGAT3-CFP por todo o citoplasma (Figura 14), indicando que esta proteína localiza-se na região citoplasmática de plantas.

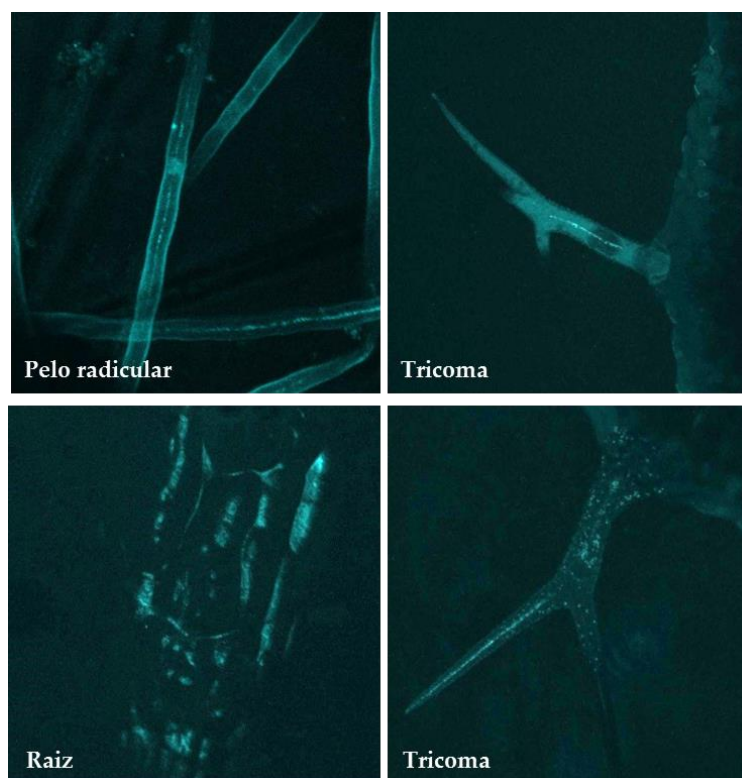


Figura 14 Imagens de microscopia de fluorescência confocal de diferentes tecidos de *A. thaliana* expressando RcDGAT3-CFP.

4.7 Caracterização de *A. thaliana* que expressam RcDGAT3-CFP

O nível de expressão do mRNA do transgene RcDGAT3-CFP foi avaliado por RT-qPCR em plântulas T3 de *A. thaliana*. Das 9 diferentes linhagens testadas, todas o mRNA correspondente a RcDGAT3 (Figura 15). Foi observado também uma variação na taxa de expressão *steady-state* entre as linhagens, sendo a linhagem #6 a que apresenta os níveis mais elevados de mRNA, sendo este até 50 vezes maior que a linhagem #1 (Figura 15).

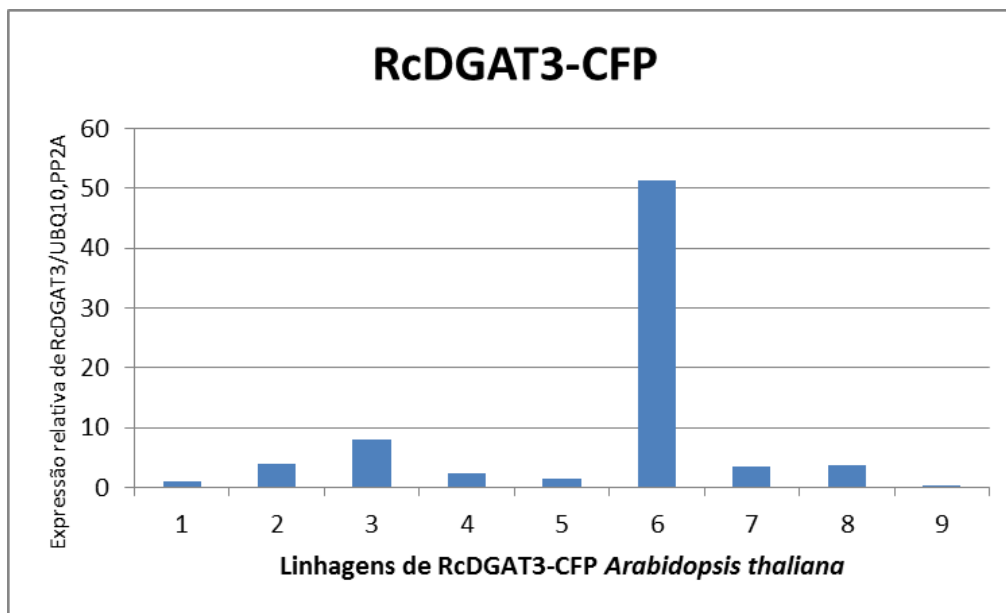


Figura 15 RT-qPCR mostrando a expressão relativa de RcDGAT3-CFP em diferentes linhagens T3 de *Arabidopsis thaliana*. Expressão relativa média referente à linhagem 1 e aos genes de referência AtUBQ10 e AtPP2A.

Para confirmar que a proteína RcDGAT3-CFP também estava sendo expressa, e que as imagens obtidas na Figura 13 representavam a proteína fusionada a CFP, e não apenas a proteína de fluorescência, um *Western blot* com anticorpo anti-GFP foi realizado. Como mostrado na Figura 16, a proteína foi detectada nos 4 extratos totais de proteínas de plântulas de *Arabidopsis* T3 (Figura 16, canaletas 2 e 1), ou T4 (Figura 16, canaletas 4 e 6).

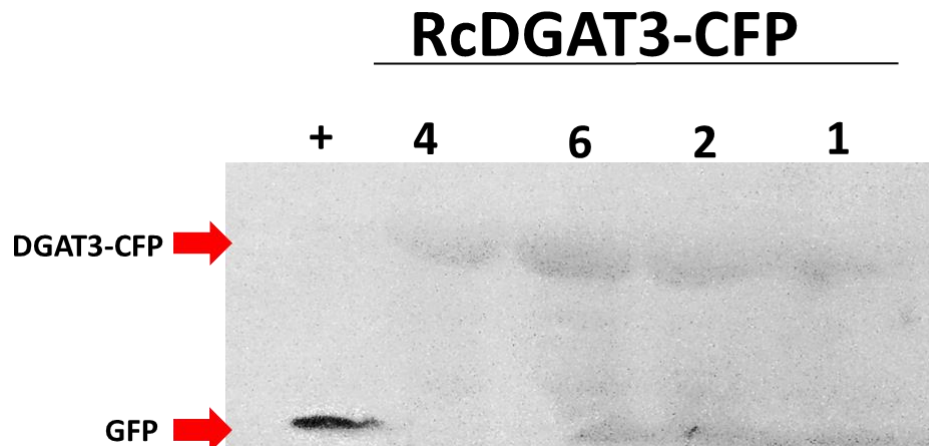


Figura 16 *Western blot*, hibridizado com um anticorpo específico para GFP, do extrato proteico das linhagens de *A. thaliana* expressando RcDGAT3-CFP. Números correspondem às linhagens avaliadas na figura (14) e (+) corresponde à uma planta controle expressando GFP.

4.8 Sementes T3 de *A. thaliana* superexpressando RcDGAT3-CFP têm perfil de ácidos graxos similar aos de sementes selvagens (WT)

Visando entender se a superexpressão de RcDGAT3 levaria à alguma mudança na composição de ácidos graxos em sementes de *Arabidopsis*, extratos de sementes foram analisados por cromatografia a gás com detector de ionização em chama (GC-FID). Ácidos graxos foram derivatizados a ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES), para diminuir suas polaridades e tornarem-se, assim, adequados para a separação no GC-FID.

O padrão de FAMES identificados tanto em sementes do tipo selvagem (WT), quanto nas sementes transgênicas (T3-6) foi o mesmo (Figura 17); entretanto, em relação ao perfil quantitativo, parece haver uma diferença na proporção de ácido palmítico entre as amostras, com menor acúmulo nas plantas que expressam RcDGAT3-CFP (Figura 18). Apesar das diferenças observadas, esta análise necessita ser repetida, pois a concentração total de ácidos graxos foi muito baixa nas amostras testadas. Os ensaios serão realizados a partir de uma quantidade maior de sementes para a preparação da amostra. Desta forma, pretende-se melhorar a resolução da cromatografia e identificar se RcDGAT3 tem algum efeito na composição do óleo da semente quando expressa em *Arabidopsis*.

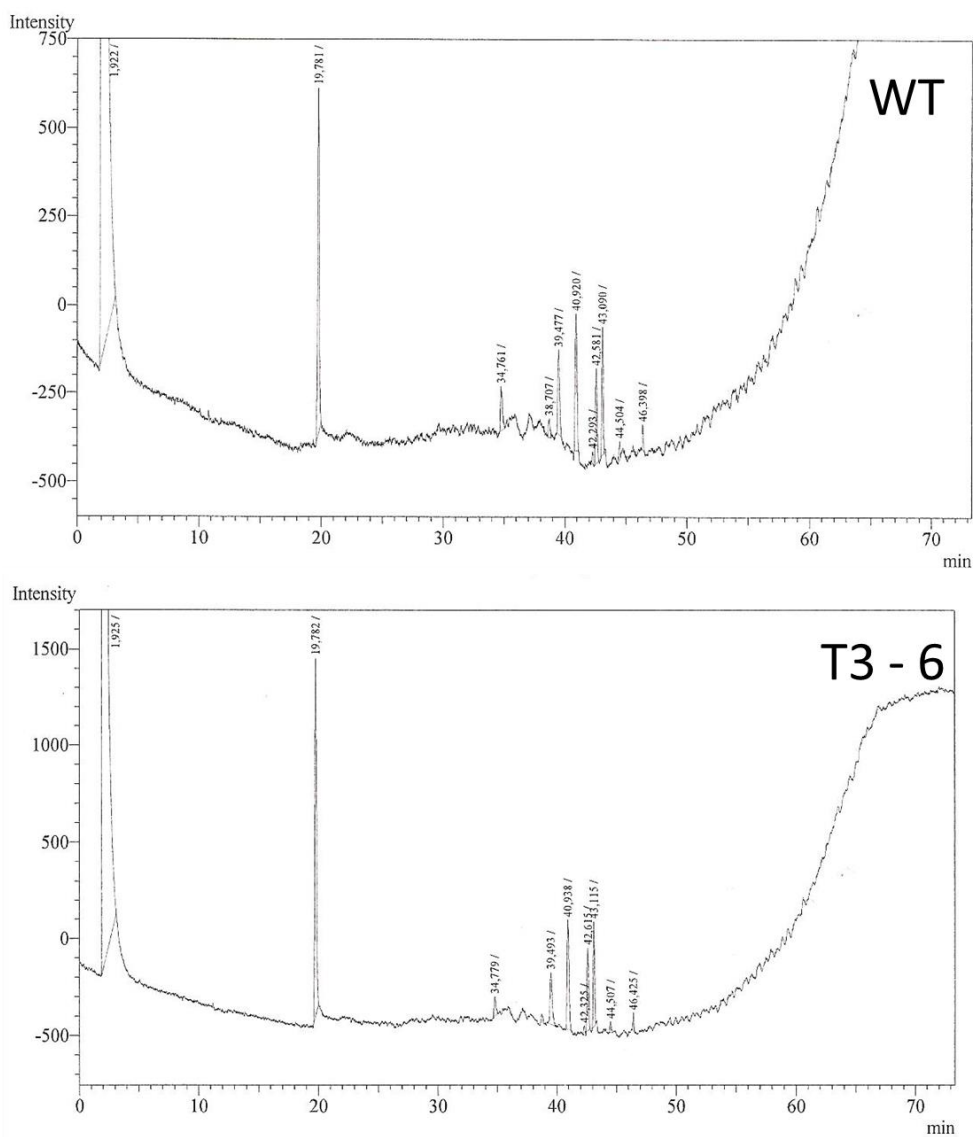


Figura 17 Perfil de ácidos graxos em sementes de *A. thaliana* do tipo selvagem (WT) e de linhagens expressando RcDGAT3-CFP (T3-6). Ácidos graxos foram derivatizados para formarem FAMES e, então, separados por cromatografia gasosa (GC-FID). Valores nos picos são referentes ao tempo de retenção de cada FAME.

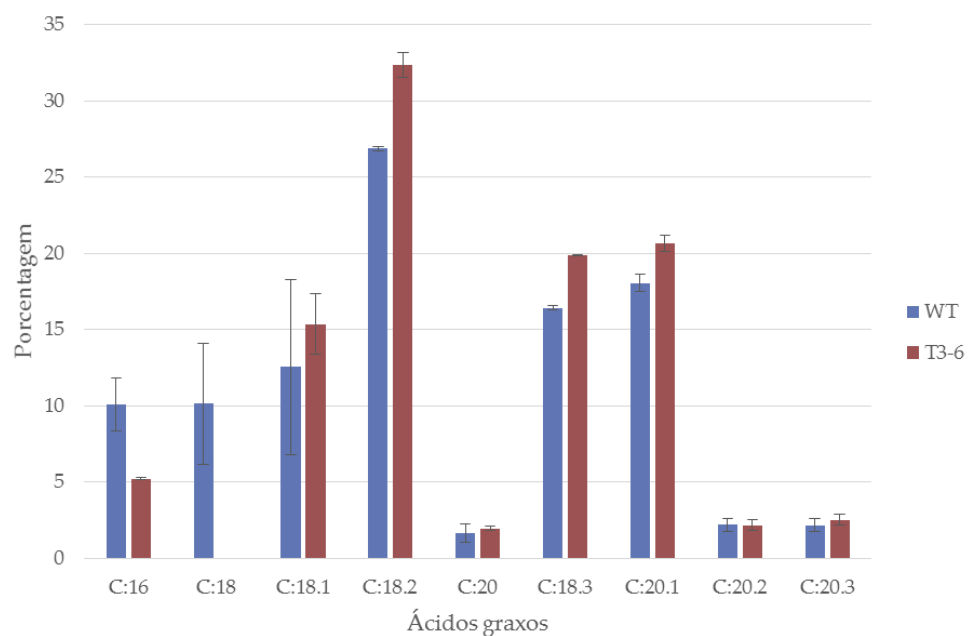


Figura 18 Perfil quantitativo de ácidos graxos em sementes de *A. thaliana* expressando RcDGAT3-CFP. O gráfico mostra a porcentagem de cada ácido graxo nas sementes de *A. thaliana* do tipo selvagem (WT) e expressando RcDGAT3-CFP (T3-6).

5 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

A demanda por fontes renováveis de combustíveis vem crescendo, assim como a necessidade de encontrar alternativas para aumentar a produção de matéria-prima dos mesmos. Óleos vegetais têm sido destinados a diferentes aplicações não só na área de biocombustíveis, mas também na indústria (Napier and Graham, 2010). O entendimento da síntese de ácidos graxos e de seu estoque em plantas é, por isso, de extrema importância, tendo como uma de suas principais finalidades a geração de ferramentas para o acúmulo de lipídeos em vegetais.

As enzimas do tipo DGAT são conhecidas por serem as enzimas responsáveis na formação de TAGs em diversos organismos e estarem associadas ao retículo endoplasmático (Shockey et al., 2006, Cases et al., 2001). Em plantas oleaginosas, onde o acúmulo e presença de triglicerídeos é principalmente encontrado nas sementes, DGATs do tipo 1 e tipo 2 têm expressão relativamente alta neste tecido (Cao et al., 2013); as DGATs solúveis, entretanto, não apresentam localização nas membranas do retículo endoplasmático, e sua expressão varia entre diferentes espécies e tecidos (Chi et al., 2014, Cao et al., 2013, Hernández et al., 2012).

A DGAT solúvel de mamona (RcDGAT3) é expressa durante o desenvolvimento de sua semente, tendo o ápice de sua expressão na fase S2 (Figura 7), onde a semente está totalmente expandida e ainda não está pigmentada (Cagliari et al., 2010). Dados do transcriptoma de mamona mostram que a expressão da DGAT3 é relativamente maior em folhas do que nos outros tecidos (Brown et al., 2012). Um resultado parecido também foi obtido em tungue (*Vernicia fordii*), onde se viu que esta enzima é mais expressa em flores e folhas que nas sementes (Cao et al., 2013). Hernández e colaboradores propõem que a DGAT solúvel possa estar relacionada com o gerenciamento do *pool* de acil-CoA e de sua composição em resposta às necessidades na biossíntese de lipídeos de membrana (Hernández et al., 2012). Oleossomos também são encontrados em folhas de plantas e são compostos principalmente por TAGs, embora a sua proporção lipídica nesse tecido seja menor que em sementes (em torno de 1-5% dos lipídeos totais de folhas) (Murphy e Parker, 1984).

Expressão de enzimas do tipo DAcT não foram detectadas de forma significativa em sementes em desenvolvimento de mamona (dado não mostrado). Resultados similares foram obtidos com DAcTs de soja, embora uma DAcT putativa tenha tido alta expressão na semente

(Turchetto-Zolet et al., dados não publicados). Isso pode indicar que estes genes não contribuem significativamente com a síntese de TAGs nas sementes dessas espécies. Embora acetil-CoA seja uma molécula fundamental para o metabolismo em diversas rotas celulares, TAGs com *sn*-3-acetil nunca foram estudados/encontrados em sementes de mamona até o presente momento. Isso possivelmente é devido à maneira que os ácidos graxos são estudados, utilizando-se cromatógrafos a gás com colunas que não conseguem detectar moléculas de dois carbonos (Cao et al., 2013, Hernández et al., 2012). Metodologias utilizando espectrômetros de massas como detectores vêm sendo empregadas para uma melhor resolução do perfil de ácidos graxos em TAGs (Li et al., 2014a, Li et al., 2014b); entretanto, ainda não foi dada a atenção devida para a identificação acTAGs em mamona, sendo analisados íons com massa molecular maior do que 800 (valor inicial de TAGs de cadeia longa ionizados) (Brown et al., 2012).

O entendimento das funções enzimáticas dessas enzimas putativas é de extrema importância para inferir se elas pertencem à família das DGATs. Leveduras da linhagem H1246, incapazes de sintetizar triglicerídeos foram utilizadas para verificar se as enzimas tinham capacidade de complementar o fenótipo mutante. Em 24 horas de crescimento não foi detectada a produção de TAGs pelas leveduras que expressavam RcDGAT3 e RcDAcTA, possivelmente porque essas leveduras estavam consumindo quaisquer fonte de carbono para seu crescimento/divisão celular, ou também pela baixa afinidade dos substratos disponíveis neste período de tempo (Figura 8). Tanto RcDGAT3 e RcDAcTA foram capazes de produzir triglicerídeos após 72 horas de crescimento (Figura 8), o que indica que ambas as enzimas que possuem atividade de DGAT codificam enzimas funcionais para a síntese de TAG. Turchetto-Zolet e colaboradores realizaram o mesmo experimento para testar se DGAT1 e DGAT2 de mamona conseguiam recuperar o fenótipo de síntese de TAGs, onde foi visto que apenas RcDGAT1 tem esta capacidade (Turchetto-Zolet et al., 2011).

A análise de fluorescência de *Nile red* nos mutantes também poderia trazer informações sobre a síntese de lipídeos neutros nessas células. *Nile red* é um composto capaz de detectar diferentes tipos de lipídeos, dependendo do comprimento de onda do filtro de excitação e de emissão (Li et al., 2015), e já foi utilizado para detectar tanto lipídeos de diferentes tecidos de plantas, quanto para células de leveduras (Huang et al., 2013, Siloto et al., 2006, Aymé et al., 2014). Siloto e colaboradores mostraram também que a fluorescência de *Nile red* estava

correlacionado com a atividade de DGAT em leveduras na fase estacionária *in vivo* (Siloto et al., 2009). Embora RcDGAT1 tenha apresentado um valor alto de variação de fluorescência neste experimento, tanto RcDGAT3 e RcDAcTA não apresentaram diferença em relação ao controle negativo (Figura 9). Hernández e colaboradores sugerem que a DGAT solúvel tenha preferência por ácidos graxos com mais de uma insaturação (ácido linoleico e ácido linolênico) (Hernández et al., 2012), lipídeos não encontrados em abundância em *Saccharomyces cerevisiae* (Daum et al., 1998, Shi et al., 2012). A baixa fluorescência nas células de leveduras que expressavam RcDGAT3 pode estar relacionada à especificidade desta enzima por substratos não encontrados em células de leveduras. Para melhor elucidar de quais ácidos graxos foram inseridos nos TAGs produzidos pelas leveduras mutantes que tiveram seus fenótipos complementados por RcDGAT3 e RcDAcTA, o uso da espectrometria de massas utilizando o método de perda neutra poderá ser utilizado (Li et al., 2014b, Li et al., 2014a). Este método permite identificar a composição de ácidos graxos nos triglicerídeos sem precisar transformá-los em ésteres metílicos de ácidos graxos, uma metodologia que facilitaria a identificação de acTAGs.

Quando as células das leveduras foram visualizadas em microscópio de fluorescência, diferentes intensidades de fluorescência foram observadas (Figura 10). Estas diferenças possivelmente estão relacionadas à concentração de diversas espécies de lipídeos encontrados dentro das células, estes que não são diferenciados por causa da amplitude do filtro de emissão utilizado. Para uma melhor resolução das imagens mostrando o óleo produzido pelas leveduras, um meio de cultura que permita a maior expansão das células e acúmulo de lipídeos pode ser utilizado (Poli et al., 2013), além de um microscópio com um filtro que consiga detectar as diferentes espécies de lipídeos.

A enzima diacilglicerol aciltransferase solúvel foi primeiramente identificada na fração citosólica de sementes imaturas de amendoim (Saha et al., 2006) revelando uma possível rota alternativa para a biossíntese de triglicerídeos da já conhecida no retículo endoplasmático (Bates et al., 2013). Protoplastos provenientes de *A. thaliana* foram transformados com as sequências codificadoras de RcDGAT3 e RcDAcTA fusionadas a YFP para identificar a localização subcelular destas enzimas. RcDAcTA possui 8 possíveis domínios transmembrana e está localizada nas membranas do retículo endoplasmático (Figura 11 e 12). RcDGAT3 não possui nenhum domínio transmembrana, assim como as outras DGAT3 putativas (Turchetto-Zolet et al.,

dados não publicados). Esta enzima, quando fusionada com CFP e vista *in planta*, está localizada no citoplasma das células vegetais (Figura 14). Para uma melhor resolução de onde RcDGAT3 está localizada, um experimento de expressão transiente em *Nicotiana benthamiana*, utilizando marcadores de organelas (vacúolo, cloroplasto, núcleo) fusionadas à CFP, poderá ser realizado (Nelson et al., 2007). Este experimento corroboraria que DGAT3 de mamona está localizada no citoplasma.

Já foi proposto que enzimas do tipo DGAT não têm papel redundante, e que sua expressão poderia levar a diferentes composições de ácidos graxos nos triglicerídeos (Chen et al., 2007, Shockey et al., 2006). Para verificar se a expressão de RcDGAT3 teria algum efeito no fenótipo de plantas de outras espécies, *A. thaliana* foi transformada, e suas progênes foram testadas em relação à expressão de RcDGAT3-CFP (Figuras 13, 15 e 16). Uma das linhagens (#6) apresentou expressão relativa maior que as outras, presumivelmente pelo local onde a construção foi inserida no genoma, ou até mesmo pelo seu número de cópias. Esta linhagem foi utilizada para comparar o perfil de ácidos graxos de suas sementes com as de *A. thaliana* do tipo selvagem (WT), onde, inicialmente, não foi possível demonstrar alguma diferença qualitativa (Figura 17). Para verificar se a expressão de RcDGAT3 altera o fenótipo de *A. thaliana*, será necessário repetir o experimento com uma maior quantidade inicial de material, com a finalidade de diminuir o ruído e identificar supostas mudanças na proporção de ácidos graxos que compõe os triglicerídeos das sementes dessas plantas.

A confirmação da atividade DGAT dessas enzimas *in vitro* também é importante do ponto de vista biotecnológico. Enzimas do tipo acil-transferase podem apresentar a capacidade de realizar a reação inversa (lipase) e liberar a molécula de acila (Neang et al., 2014). Utilizando este princípio, o ensaio do *para*-nitrofenil palmitato poderá ser realizado para avaliar a atividade enzimática dessas proteínas (Gupta et al., 2002). A obtenção dessas enzimas será realizada a partir da clonagem de RcDGAT3 e RcDAcTA em vetores TRBO (Kagale et al., 2012, Lindbo, 2007), sendo expressos de forma transiente em *Nicotiana benthamiana*, e sua purificação efetuada via cromatografia de afinidade.

6 REFERÊNCIAS

- AYMÉ, L., BAUD, S., DUBREUCQ, B., JOFFRE, F., CHARDOT, T. Function and localization of the *Arabidopsis thaliana* diacylglycerol acyltransferase DGAT2 expressed in yeast. **PLoS One**, v. 9, e92237, 2014.
- BATES, P. D., STYMNE, S., OHLROGGE, J. Biochemical pathways in seed oil synthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 358-64, 2013.
- BELTRÃO, N., E., M., OLIVEIRA, M., I., P. Oleaginosas e seus óleos: vantagens e desvantagens para produção de biodiesel. **EMBRAPA**, v. 201, p. 12-28, 2008.
- BROWN, A. P., KROON, J. T., SWARBRECK, D., FEBRER, M., LARSON, T. R., GRAHAM, I. A., CACCAMO, M., SLABAS, A. R. Tissue-specific whole transcriptome sequencing in castor, directed at understanding triacylglycerol lipid biosynthetic pathways. **PLoS One**, v.7, e30100, 2012.
- BUHR, T., SATO, S., EBRAHIM, F., XING, A., ZHOU, Y., MATHIESEN, M., SCHWEIGER, B., KINNEY, A., STASWICK, P. & CLEMENTE, T. Ribozyme termination of RNA transcripts down-regulate seed fatty acid genes in transgenic soybean. **Plant Journal**, v. 30, p. 155-63, 2002.
- BURGAL, J., SHOCKEY, J., LU, C., DYER, J., LARSON, T., GRAHAM, I., BROWSE, J. Metabolic engineering of hydroxy fatty acid production in plants: RcDGAT2 drives dramatic increases in ricinoleate levels in seed oil. **Plant Biotechnology Journal**, v. 6, p. 819-31, 2008.
- CAGLIARI, A., MARGIS, R., MARASCHIN, F., S., TURCHETTO-ZOLET, A., C., MARGIS-PINHEIRO, M. Biosynthesis of Triacylglycerols (TAGs) in plants and algae. **International Journal of Plant Biology**, v: 2, e10, 2011.
- CAGLIARI, A., MARGIS-PINHEIRO, M., LOSS, G., MASTROBERTI, A. A., DE ARAUJO MARIATH, J. E., MARGIS, R. Identification and expression analysis of castor bean (*Ricinus communis*) genes encoding enzymes from the triacylglycerol biosynthesis pathway. **Plant Science**, v. 179, p. 499-509, 2010.
- CAO, H., SHOCKEY, J. M., KLASSON, K. T., CHAPITAL, D. C., MASON, C. B., SCHEFFLER, B. E. Developmental regulation of diacylglycerol acyltransferase family gene expression in tung tree tissues. **PLoS One**, v. 8, e76946, 2013.
- CASES, S., STONE, S. J., ZHOU, P., YEN, E., TOW, B., LARDIZABAL, K. D., VOELKER, T., FARESE, R. V. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 38870-6, 2001.
- 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**, v. 42, p. 263-74, 2007.
- CHI, X., HU, R., ZHANG, X., CHEN, M., CHEN, N., PAN, L., WANG, T., WANG, M., YANG, Z., WANG, Q., YU, S. Cloning and functional analysis of three diacylglycerol acyltransferase genes from peanut (*Arachis hypogaea* L.). **PLoS One**, v. 9, e105834, 2014.

- DAUM, G., LEES, N. D., BARD, M., DICKSON, R. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, p. 1471-510, 1998.
- DURRETT, T. P., BENNING, C., OHLROGGE, J. Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. **Plant Journal**, v. 54, p. 593-607, 2008.
- DURRETT, T. P., MCCLOSKEY, D. D., TUMANAY, A. W., ELZINGA, D. A., OHLROGGE, J., POLLARD, M. A distinct DGAT with sn-3 acetyltransferase activity that synthesizes unusual, reduced-viscosity oils in *Euonymus* and transgenic seeds. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 107, p. 9464-9, 2010.
- DYER, J. M., MULLEN, R. T. Engineering plant oils as high-value industrial feedstocks for biorefining: the need for underpinning cell biology research. **Physiologia Plantarum**, v. 132, p. 11-22, 2008.
- GUPTA, N., RATHI, P., GUPTA, R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. **Analytical Biochemistry**, v. 311, p. 98-9, 2002.
- HERNÁNDEZ, M. L., WHITEHEAD, L., HE, Z., GAZDA, V., GILDAY, A., KOZHEVNIKOVA, E., VAISTIJ, F. E., LARSON, T. R., GRAHAM, I. A. A cytosolic acyltransferase contributes to triacylglycerol synthesis in sucrose-rescued *Arabidopsis* seed oil catabolism mutants. **Plant Physiology**, v. 160, p. 215-25, 2012.
- HILL, J., NELSON, E., TILMAN, D., POLASKY, S., TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 103, p. 11206-10, 2006.
- HUANG, C. Y., CHEN, P. Y., HUANG, M. D., TSOU, C. H., JANE, W. N., HUANG, A. H. Tandem oleosin genes in a cluster acquired in *Brassicaceae* created tapetosomes and conferred additive benefit of pollen vigor. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 110, p. 14480-5, 2013.
- 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**, v. 958, p. 125-9, 1988.
- JAWORSKI, J., CAHOON, E. B. Industrial oils from transgenic plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 178-84, 2003.
- KAGALE, S., UZUHASHI, S., WIGNESS, M., BENDER, T., YANG, W., BORHAN, M. H., ROZWADOWSKI, K. TMV-Gate vectors: gateway compatible tobacco mosaic virus based expression vectors for functional analysis of proteins. **Scientific Reports**, v. 2, p. 874, 2012.
- KARIMI, M., DE MEYER, B., HILSON, P. Modular cloning in plant cells. **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 103-5, 2005.
- KROON, J. T., WEI, W., SIMON, W. J., SLABAS, A. R. Identification and functional expression of a type 2 acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) in developing castor bean seeds which has high homology to the major triglyceride biosynthetic enzyme of fungi and animals. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2541-9, 2006.

- LI, M., BAUGHMAN, E., ROTH, M. R., HAN, X., WELTI, R., WANG, X. Quantitative profiling and pattern analysis of triacylglycerol species in *Arabidopsis* seeds by electrospray ionization mass spectrometry. **Plant Journal**, v. 77, p.160-72, 2014a.
- LI, M., BUTKA, E., WANG, X. Comprehensive quantification of triacylglycerols in soybean seeds by electrospray ionization mass spectrometry with multiple neutral loss scans. **Scientific Reports**, v. 4, p. 6581, 2014b.
- LI, R., SUN, R., HICKS, G. R., RAIKHEL, N. V. *Arabidopsis* ribosomal proteins control vacuole trafficking and developmental programs through the regulation of lipid metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 112, p. 89-98, 2015.
- LI, R., YU, K., HILDEBRAND, D. F. DGAT1, DGAT2 and PDAT expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants. **Lipids**, v. 45, p. 145-57, 2010.
- LI-BEISSON, Y., SHORROSH, B., BEISSON, F., ANDERSSON, M. X., ARONDEL, V., BATES, P. D., BAUD, S., BIRD, D., DEBONO, A., DURRETT, T. P., FRANKE, R. B., GRAHAM, I. A., KATAYAMA, K., KELLY, A. A., LARSON, T., MARKHAM, J. E., MIQUEL, M., MOLINA, I., NISHIDA, I., ROWLAND, O., SAMUELS, L., SCHMID, K. M., WADA, H., WELTI, R., XU, C., ZALLOT, R., OHLROGGE, J. Acyl-lipid metabolism. **Arabidopsis Book**, v. 8, e0133, 2010.
- LINDBO, J. A. TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector. **Plant Physiology**, v. 145, p. 1232-40, 2007.
- LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, p. 402-8, 2001.
- MEMELINK, J., SWORDS K. M. M., STAEHELIN L. A., HOGE, J.H. Southern, Northern and Western blot analysis. **Plant Molecular Biology Manual**, p. 1-23, 1994.
- MURPHY, G., J., P., PARKER, M., L. Lipid Composition and carbon turnover of wheat leaf oleosomes. **Journal of Experimental Botany**, v. 152, p. 348-355, 1984.
- NAPIER, J. A. & GRAHAM, I. A. Tailoring plant lipid composition: designer oilseeds come of age. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, p. 330-7, 2010.
- NEANG, P. M., SUBILEAU, M., PERRIER, V., DUBREUCQ, E. Homologous yeast lipases/acyltransferases exhibit remarkable cold-active properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 8927-36, 2014.
- NELSON, B. K., CAI, X., NEBENFÜHR, A. A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. **Plant Journal**, v. 51, p. 1126-36, 2007.
- PAN, X., SILOTO, R. M., WICKRAMARATHNA, A. D., MIETKIEWSKA, E., WESELAKE, R. J. Identification of a pair of phospholipid:diacylglycerol acyltransferases from developing flax (*Linum usitatissimum* L.) seed catalyzing the selective production of trilinolenin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 24173-88, 2013.
- PENG, Z., LI, L., YANG, L., ZHANG, B., CHEN, G., BI, Y. Overexpression of peanut diacylglycerol acyltransferase 2 in *Escherichia coli*. **PLoS One**, v. 8, e61363, 2013.

- POLI, J., S., DALLÉ, P., SENTER, L., MENDES, S., RAMIREZ, M., VAINSTEIN, M., H., VALENTE, P. Fatty acid methyl esters produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 2, p. 203-208, 2013.
- ROGALSKI, M., CARRER, H. Engineering plastid fatty acid biosynthesis to improve food quality and biofuel production in higher plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, p. 554-64, 2011.
- RUIZ, M. T., VOINNET, O., BAULCOMBE, D. C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. **Plant Cell**, v. 10, p. 937-46, 1998.
- SAHA, S., ENUGUTTI, B., RAJAKUMARI, S., RAJASEKHARAN, R. Cytosolic triacylglycerol biosynthetic pathway in oilseeds. Molecular cloning and expression of peanut cytosolic diacylglycerol acyltransferase. **Plant Physiology**, v. 141, p. 1533-43, 2006.
- SANDAGER, L., GUSTAVSSON, M. H., STÅHL, U., DAHLQVIST, A., WIBERG, E., BANAS, A., LENMAN, M., RONNE, H., STYMNE, S. Storage lipid synthesis is non-essential in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 6478-82, 2002.
- SHEEN, J. A transient expression assay using *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. Disponível em: <<http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/>>. Acesso: 04/05/2013.
- SHI, S., VALLE-RODRÍGUEZ, J. O., KHOOMRUNG, S., SIEWERS, V., NIELSEN, J. Functional expression and characterization of five wax ester synthases in *Saccharomyces cerevisiae* and their utility for biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 7, 2012.
- SHOCKEY, J. M., GIDDA, S. K., CHAPITAL, D. C., KUAN, J. C., DHANOA, P. K., BLAND, J. M., ROTHSTEIN, S. J., MULLEN, R. T., DYER, J. M. Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. **Plant Cell**, v. 18, p. 2294-313, 2006.
- SILOTO, R. M., FINDLAY, K., LOPEZ-VILLALOBOS, A., YEUNG, E. C., NYKIFORUK, C. L., MOLONEY, M. M. The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 18, 1961-74, 2006
- SILOTO, R. M., TRUKSA, M., HE, X., MCKEON, T., WESELAKE, R. J. Simple methods to detect triacylglycerol biosynthesis in a yeast-based recombinant system. **Lipids**, 44, 963-73, 2009.
- SPARKES, I., TOLLEY, N., ALLER, I., SVOZIL, J., OSTERRIEDER, A., BOTCHWAY, S., MUELLER, C., FRIGERIO, L., HAWES, C. Five *Arabidopsis* reticulon isoforms share endoplasmic reticulum location, topology, and membrane-shaping properties. **Plant Cell**, v. 22, p. 1333-43, 2010.
- TOLLEY, N., SPARKES, I. A., HUNTER, P. R., CRADDOCK, C. P., NUTTALL, J., ROBERTS, L. M., HAWES, C., PEDRAZZINI, E., FRIGERIO, L. Overexpression of a plant reticulon remodels the lumen of the cortical endoplasmic reticulum but does not perturb protein transport. **Traffic**, v. 9, p. 94-102, 2008.
- TSUGAMA, D., LIU, S., TAKANO, T. A rapid chemical method for lysing *Arabidopsis* cells for protein analysis. **Plant Methods**, v. 7, p. 22, 2011.

TURCHETTO-ZOLET, A. C., MARASCHIN, F. S., DE MORAIS, G. L., CAGLIARI, A., ANDRADE, C. M., MARGIS-PINHEIRO, M., MARGIS, R. Evolutionary view of acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase (DGAT), a key enzyme in neutral lipid biosynthesis. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 263, 2011.

VERNET, T., DIGNARD, D., THOMAS, D. Y. A family of yeast expression vectors containing the phage f1 intergenic region. **Gene**, v. 52, p. 225-33, 1987.

VOELKER, T., KINNEY, A. J. Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 335-361, 2001.

WU, F. H., SHEN, S. C., LEE, L. Y., LEE, S. H., CHAN, M. T., LIN, C. S. Tape-Arabidopsis Sandwich - a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. **Plant Methods**, v. 5, p. 16, 2009.

ZHANG, X., HENRIQUES, R., LIN, S. S., NIU, Q. W., CHUA, N. H. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. **Nature Protocols**, v. 1, p. 641-6, 2006.