

GENES CODIFICANDO TERPENO SINTASES EM GENOMA DE CITROS

THAÍS R. T. SAKAMOTO¹; MARCO AURÉLIO TAKITA²

Nº 12149

RESUMO

Terpenos são os produtos naturais mais abundantes na natureza, sendo também os principais componentes do óleo essencial de citros. São produtos da atividade de enzimas conhecidas como terpeno sintases e a busca por genes que codificam estas enzimas em *Citrus clementina* e *Citrus sinensis* identificou 66 e 57 genes, respectivamente. O alinhamento destas sequências possibilitou verificar-se quais genes eram idênticos nos genomas, o que mostrou que 26 pares de sequências são idênticos nas duas espécies, 9 em laranja doce e 8 em clementina. Análises de Blast mostram que de todas as sequências de laranja doce existem em clementina, mas nem todas as sequências de clementina existem em laranja doce, o que pode ser resultado do genoma ainda não estar totalmente finalizado. Para obtenção de dados de genomas completos foram feitas extrações de DNA genômico usando-se dois diferentes protocolos, onde o protocolo 1 apresentou melhores resultados quando comparado com o protocolo 2. De posse das sequências dos genes que codificam terpeno sintases, foram desenhados primers. Estes primers foram usados para amplificação das regiões codificadoras dos genes, a partir dos clones disponíveis no banco de clones do IAC submetidos a minipreparações de plasmídeos. Os amplicons apresentaram resultados esperados. Estes DNAs estão sendo clonados em vetor de expressão para a realização de trabalhos funcionais na próxima etapa.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, UFSCar, Araras- SP, thais_r_sakamoto@hotmail.com.

² Orientador: Pesquisador, Centro de Citricultura- IAC, Cordeirópolis- SP, takita@centrodecitricultura.br.

ABSTRACT

Terpenes are the most abundant natural products. They are also the main component of the citrus essential oil. They are produced by the activity of enzymes known as terpene synthases. The search for genes encoding these enzymes in *Citrus clementina* and *Citrus sinensis* identified 66 and 57 genes, respectively. The alignment of these sequences allowed the identification of identities in both genomes or inside each genome. Twenty-six sequences are identical in both species, nine in sweet orange and eight in clementine mandarin. Blast analysis showed that all sequences of sweet orange exist in Clementine but not all the sequences exist in clementina mandarin, which may be the result of the genome that has not yet been completely sequenced. To increase the amount of data for complete genomes of citrus, genomic DNA from different citrus species were prepared using two different protocols. Protocol 1 showed better results compared with protocol 2. Having the gene sequences encoding terpene synthases, primers were designed. These primers were used for amplify the coding regions of genes from the clones available in the clone bank of the IAC. The amplicons showed expected results. These DNAs are in the process of being cloned into the expression vector for functional studies in the next step.

INTRODUÇÃO

O Laboratório de Biotecnologia de Citros do Centro APTA Citros "Sylvio Moreira" do Instituto Agronômico de Campinas coordenou recentemente um projeto de sequenciamento de ESTs de Citros (CitEST - Programa Institutos do Milênio), constituindo-se no maior banco de seqüências de citros do mundo gerado em um único laboratório. O Centro de Citricultura Sylvio Moreira contribuiu também para o sequenciamento completo do genoma de citros, dentro do Consórcio Internacional de Citros. Com isto, hoje, a base de dados apresenta grande parte dos genes expressos de citros, dando uma ampla visão do genoma expresso deste gênero e outros correlatos, além de apresentar o genoma completo de *Citrus clementina* e genomas parciais de *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, *Citrus limonia*, e *Poncirus trifoliata*. Tantos dados de seqüência permite-nos avaliar, de uma forma mais completa os genoma de diferentes espécies, principalmente laranja doce (*C. sinensis*) e clementina (*C. clementina*), por apresentarem maior cobertura. Isto possibilita um grande avanço no conhecimento da coleção de genes de cada organismo e estudos de famílias gênicas.

A busca por seqüências relacionados à síntese de terpenos dentro do CitEST, em sua forma antiga, havia mostrado a presença de todos os componentes das vias de síntese de IPP e DMAPP em citros (Takita e col., 2007). Além disso, foram encontradas 49 possíveis seqüências codificando terpeno sintases em Citros e gêneros correlatos (Dornelas e Mazzafera, 2007). A caracterização funcional da maioria destas terpeno sintases ainda não foi realizada e, portanto, seus produtos ainda são desconhecidos.

Os terpenos afetam a qualidade dos frutos, pois o aroma e sabor são diretamente influenciados por compostos presentes no óleo essencial de citros. Interessantemente, melhoramento clássico visando o aprimoramento destes dois tratos são extremamente complicados e de difícil execução. Neste sentido, o entendimento dos processos que determinam a qualidade dos óleos essenciais de plantas de modo geral e de citros especificamente é fundamental para o desenvolvimento de ferramentas que possibilitem uma agilidade maior na produção de plantas melhoradas, quer seja por cruzamentos clássicos ou por engenharia genética em um processo mais especificamente conhecido como engenharia metabólica. Para tanto é fundamental a identificação de genes que estejam envolvidos com os processos metabólicos desejados.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi a análise dos genomas de laranja doce e clementina visando a identificação de seqüências codificadoras de terpeno sintases. Também buscou-se preparar DNAs de outras espécies de citros de modo a aumentar a base de dados de genomas para utilização na identificação e posterior clonagem dos genes codificando terpeno sintases.

MATERIAL E MÉTODOS

Análises de bioinformática

Sequências de terpeno sintases foram identificadas e recuperadas dos genomas de laranja doce e clementina usando as ferramentas disponíveis no sítio Phytozome (www.phytozome.net). A ferramenta BLAST também foi utilizada para identificação de similaridades entre os genomas. Alinhamentos foram feitos usando o programa MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

Extração do DNA Genômico de espécies de citros como *Citrus máxima* (Toranja vermelha), *Citrus reticulata* (Ponkan), *Citrus medica* (Cidra doce), *Poncirus trifoliata*, *Citrus limonia* (Limão Cravo) e *Citrus sinensis* (Laranja doce)

Folhas jovens frescas foram maceradas com auxílio de nitrogênio líquido. Foram adicionados 15mL de Tampão de Extração (Tris HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 50 mM; NaCl 500 mM; β -Mercaptoetanol 10mM e água Milli-Q), e 1mL de SDS 20% aquecido e misturando-se por inversão. As amostras foram encubadas a 65°C por 30 minutos, e adicionados 5 mL de Acetato de Potássio 5 M, foram misturados e incubados por 30 minutos em gelo. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C, e o sobrenadante retirando-se por filtração em Miracloth. Foi adicionado 10 mL de isopropanol para precipitação. Novamente centrifugou-se a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o precipitado lavado com etanol 80%. Nova centrifugação por mais 10 minutos e descartou-se o sobrenadante e secou-se o precipitado, ressuspendendo em 500 μ L de tampão TE pH 8,0.

O DNA foi purificado em gradiente de Cloreto de Césio (1 g/mL) com Brometo de Etídio 0,9 mg. Os tubos foram centrifugados 16 horas a 55.000 rpm e 20°C. Após a corrida, a fração contendo o DNA foi isolada com auxílio de uma seringa e luz ultravioleta. O Brometo de Etídio foi retirado um ou mais volumes de com álcool isoamílico saturado em TE. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo ao qual foram adicionados dois volumes de água e seis volumes de etanol absoluto gelado. O DNA foi recuperado através de centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O coletado foi seco em temperatura ambiente e suspendido 100 μ L de TE. A quantificação do DNA foi feita por Nanodrop. Para a precipitação do DNA visando o sequenciamento adicionou-se Acetato de Sódio 3M e misturou-se gentilmente. Adicionou-se etanol 100% e misturou-se novamente.

Minipreparação para extração do DNA plasmidial e amplificação

Os clones contendo os genes codificando terpeno sintases foram crescidos em meio LB com ampicilina. Para a extração, as células foram recuperadas em água Milli-Q autoclavada. Separadas em microtubos e centrifugou-se, retirando o sobrenadante. As bactérias coletadas foram ressuspendidas em Solução I (50mM glicose, 25mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA, pH 8,0, Água), onde foram ressuspendidas em vortex. Em seguida foi adicionada a Solução II (1 N NaOH, SDS10%), invertendo os tubos várias vezes, e adicionou-se a Solução III (15 mL de 5M acetato de potássio, 2,875 mL de ácido acético glacial, completado com água em um volume total de 25 mL). A

solução foi misturada e levada para centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo. O DNA foi purificado usando-se da Miniprep Express™ Matrix (QBio), conforme instrução do fabricante. Os DNAs obtido foram utilizados em reações de polimerização em cadeia (PCR), onde foram utilizados 10x Taq Buffer, dNTP mix, primer forward e primer reverse específicos, 25mM MgCl₂, Taq DNA polimerase (Fermentas) e água Mili-Q autoclavada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca por genes de terpeno sintases resultou na identificação de 66 e 57 deles nos genomas completos de *Citrus clementina* e *Citrus sinensis*, respectivamente. As sequências destes genes foram obtidas no sítio do Phytozome e alinhadas usando o software MUSCLE. Nesta análise pode-se observar as sequências que são idênticas em termos de nucleotídeos (Figura 1).

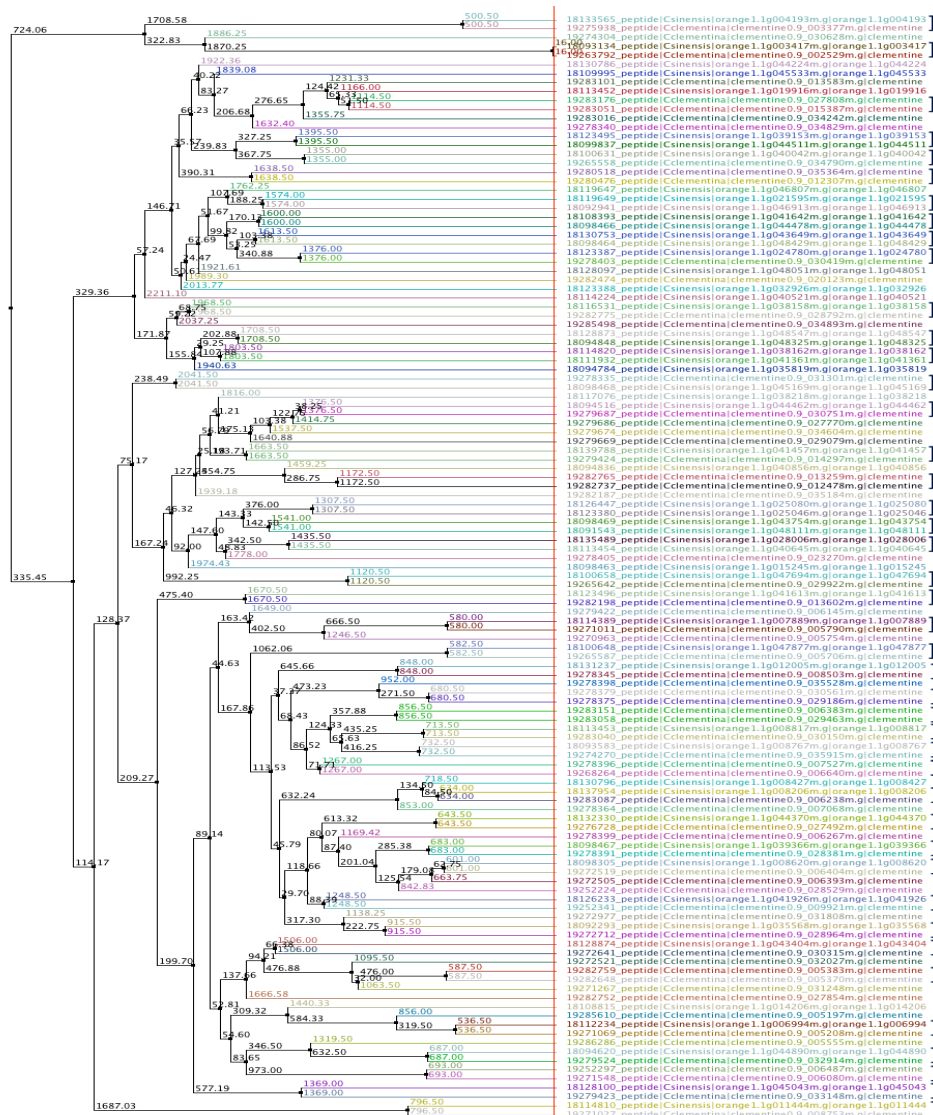


FIGURA 1. Alinhamento múltiplo das sequências de Citros. As sequências de laranja doce e *C. clementina* identificadas e obtidas no Phytozome foram alinhadas e a árvore foi construída possibilitando a identificação dos genes idênticos nas duas espécies e dentro das espécies.

Nesta análise, foram identificados 26 pares de sequências de citrôneos que existem nas duas espécies, 9 em laranja doce e 8 em clementina. Análises de Blast também mostram que de todas as sequências de laranja doce existem em clementina, mas nem todas as sequências de clementina existem em laranja doce, o que pode ser resultado do genoma ainda não estar totalmente finalizado.

Para obtenção de dados de genomas completos foram feitas extrações de DNA genômico usando-se dois diferentes protocolos (Tabela 3), onde o protocolo 1 apresentou melhores resultados quando comparado com o protocolo 2, ou seja, os

DNAs obtidos eram mais puros e apresentaram uma maior quantidade. O protocolo 1 foi utilizado 8 vezes, enquanto que o protocolo 2 foi utilizado apenas 2 vezes, onde não se mostrou tão efetivo para um possível sequenciamento. Foram obtidos DNAs genômicos nas quantidades mostradas na Tabela 1.

TABELA 1. Quantidade total de DNAs isolados de folhas de espécies de citros.

Espécie	Quantidade obtida (ug)
Cidra Doce	142
Limão Cravo	430
Pêra	287
Ponkan	146
Poncirus	167
Toranja	163

Estes DNAs foram enviados para uma empresa prestadora de serviços, MacroGen, na Coreia e lá foram sequenciados usando-se tecnologia de próxima geração. Até o momento, foram preparadas bibliotecas mate-pair de 3Kb e sequenciadas para as laranja doce, tangerina Ponkan, Toranja Vermelha, e *Poncirus trifoliata*. Os resultados estão mostrados na Tabela 2.

TABELA 2. Sequenciamento de DNA Genômico de Citrus. O sequenciamento foi realizado pela empresa MacroGen, na Coreia do Sul em um equipamento HiSeq 2000 (Illumina).

Amostra	Total de Bases	Número de Leituras	N (%)	GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
Laranja doce	31.825.094.142	315.099.942	0,079	39,62	92,26	86,88
Toranja vermelha	34.994.463.234	346.479.834	0,014	39,53	91,63	85,84
<i>Poncirus trifoliata</i>	36.139.752.330	357.819.330	0,015	40,15	86,75	80,60
Ponkan	32.324.739.526	320.046.926	0,013	39,92	92,51	86,77

No presente momento, as sequências estão sendo processadas para obtenção de “scaffolds” do genoma para comparação com o genoma referência de clementina.

De posse das sequências dos genes que codificam terpeno sintases, foram desenhados primers para amplificação de alguns deles (Tabela 3).

TABELA 3. Primers de genes que codificam terpeno sintases.

Primer	Sequência
Seq_1_NdeI	ACA TAT GGC TCT TAA TCT GCT ATC T
Seq_1_BamHI	AGG ATC CGG AGG AAC GAT TTG GT
Limoneno_Bam	GGA TCC TGG ATT ATA ATT CAT CAT CA
Limoneno_Nde	ATC TGT ATA TCA TAT GTC TTC TTG
Primer_Foward	CCA TAT GTC TTT GGA AGT TTC AGC CT
Primer_Reverse	AAT TCA TAT GTA AAA TCC AAA TCC AA
Limon_F1_NCO	CCA TGG TCC CTC ATG GCT ACC TCT GT
Limon_F2_BSTE	GGT CAC CTC CCT CTG GCT ACC TCT GT

Estes primers foram usados para amplificação das regiões codificadoras dos genes, a partir dos clones disponíveis no banco de clones do Centro de Citricultura Sylvio Moreira – IAC. Para tanto, foram feitas minipreparações de plasmídeos, os quais foram usados para amplificação da região desejada por PCR. Os resultados podem ser observados na figura 2.

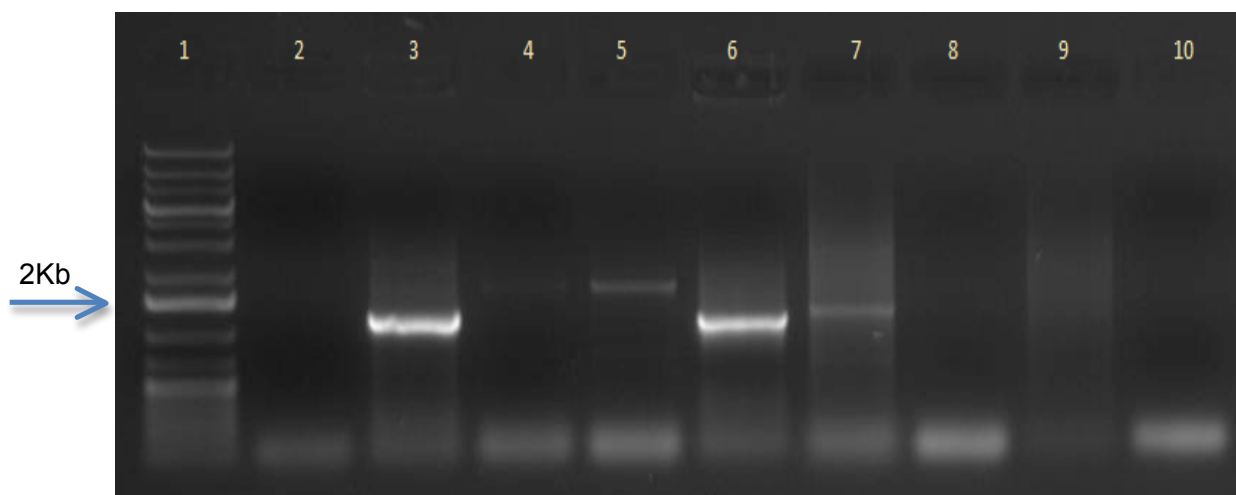


FIGURA 2. Gel de agarose 0,7% da amplificação do DNA plasmidial. 1 = Marcador GeneRuler 1Kb Plus DNA (Fermentas) ; 2 = Transformante FB01-030-A09 após minipreparação, diluição 50 vezes e amplificação com Primers Seq_1_NdeI e Seq_1_BamHI; 3= Transformante FA01-047-C10 após minipreparação, diluição 10 vezes e amplificação com Primers Seq_1_NdeI e Seq_1_BamHI; 4= Transformante FA01-027-G07 após minipreparação, diluição 50 vezes e amplificação com Primers Primer_Foward e Primer_Reverse; 5= Transformante FA01-092-G08 após minipreparação, diluição 50 vezes e amplificação com Primers Primer_Foward e Primer_Reverse; 6= Transformante FCO2-003-H10 após minipreparação, diluição 50 vezes e amplificação com Primers Seq_1_NdeI e Seq_1_BamHI;

7= Transformante FCO2-050-E06 após minipreparação, diluição 50 vezes e amplificação com Primers Limon_F1_NCO e Limon_F2_BSTE; 8= Transformante FD01-043-E09 após minipreparação, diluição 50 vezes e amplificação com Primers Primer_Foward e Primer_Reverse; 9= Transformante FD01-031-H04 após minipreparação, diluição 10 vezes e amplificação com Primers Limoneno_Bam e Limoneno_Nde; 10= Transformante FF01-014-DO8 após minipreparação, diluição 10 vezes e amplificação com Primers Limoneno_Bam e Limoneno_Nde.

Os amplicons apresentaram tamanhos entre 1,8 e 2,2 Kb, que são exatamente o que se esperava para o trabalho. Estes DNAs estão sendo clonados em vetor de expressão para a realização de trabalhos funcionais na próxima etapa.

CONCLUSÃO

A partir da pesquisa realizada, foi possível a identificação com o uso de genomas completos e ferramentas de bioinformática 66 e 57 genes de terpeno sintases em *Citrus clementina* e *Citrus sinensis*, respectivamente.

As sequências obtidas no sítio do Phytozome e alinhadas usando o software MUSCLE possibilitaram a observação das sequências que são idênticas em termos de nucleotídeos, possibilitando a identificação de 26 pares de sequências que existem nas duas espécies, 9 em laranja doce e 8 em clementina.

Algumas das regiões codificadoras de terpeno sintases foram amplificadas com sucesso e estão sendo clonadas em vetor de expressão para realização trabalhos funcionais.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao IAC, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS

Crowell, P., Lin, S., Vedejs, E., Gould, M. N. 1992. Identification of metabolites of the antitumor agent d-limonene capable of inhibiting protein isoprenylation and cell growth. *Cancer & Chemother. Pharmacol.* 31, 205-212.

Dellacassa, E., Rossini, C., Menendez, P., Moyna, P., Verzera, A., Trozzi, A., Dugo, G. 1992. Citrus essential oils of Uruguay. Part I. Composition of oils of some varieties of mandarin. J. Essent. Oil Res. 4, 265-272.

Dornelas, M. C., Mazzafera, P. 2007. A genomic approach to characterization of the Citrus terpene synthase gene family. Genet. Mol. Biol. 30 (3) suppl., 832-840.

Lücker, J., Mazen, K., El Tamer, W. S., Francel, W. A. V., Linus, H. W. van der Plas, Harro, J. B., Harrie, A. V. 2002. Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*). cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases. Eur. J. Biochem. 269, 3160–3171

Shimada, T., Endo, T., Fujii, H., Omura, M. 2005. Isolation and characterization of a new d-limonene synthase gene with a different expression pattern in *Citrus unshiu* Marc. Sci Hortic 105:507-512.

Suzuki, Y., Sakai, H., Shimada, T., Omura, M., Kumazawa, S., Nakayama, T. 2008. Characterization of g-terpinene synthase from *Citrus unshiu* (Satsuma mandarin). Biofactors 21: 79-82.

Takita, M. A., Berger, I. J., Basílio-Palmieri, A. C., Borges, K. M., Souza, J. M., Targon, M. L. P. N. 2007. Terpene production in the peel of sweet orange fruits. Genet. Mol. Biol. 30 (3) suppl., 841-847.

Targon, M. L. P. N., Takita, M. A., Amaral, A. M., Souza, A. A., Locali-Fabris, E. C., Dorta, S. O., Borges, K. M., Souza, J. M., Rodrigues, C. M., Lucheta, A. R.; Freitas-Astúa, J., Machado, M. A. 2007. CitEST libraries. Genet. Mol. Biol., 30 (3) suppl., 1019-1023.