

XVIII

CIC

XI ENPOS  
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:  
por uma ciência do devir



## EXPRESSÃO GÊNICA DA ENZIMA CAROTENÓIDE $\epsilon$ -HIDROXILASE EM GRÃOS DE MILHOS CRIoulos

**MESSIAS, Rafael<sup>1</sup>; GALLI, Vanessa<sup>2</sup>; SILVA, Sérgio Delmar dos Anjos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular – Embrapa Clima Temperado

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular – CenBiot – IB/UFPeI

Embrapa Clima Temperado – BR 392, Km 78 Caixa Postal 403. [rafaelm@cpact.embrapa.br](mailto:rafaelm@cpact.embrapa.br)

### 1 INTRODUÇÃO

A matriz complexa apresentada pelos grãos de milho mostra-se composta por 72% de amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibras e 4% de lipídios, em média. A fração endosperma representa aproximadamente 83% do peso seco do grão, sendo formada por uma matriz baseada predominantemente em amido (88%), organizado na forma de *grânulos*, e por proteínas de reserva (8%), apresentando-se em duas distribuições distintas denominadas de endosperma farináceo e vítreo (Paes, 2006).

Neste endosperma, mais especificamente, na camada de aleurona e no endosperma vítreo, encontram-se os carotenóides, pertencentes à família dos terpenos, os quais são compostos antioxidantes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, atuando no processo de fotossíntese, na proteção contra danos fotooxidativos e como precursores do ácido abscísico. Acrescentando ainda valor nutricional à dieta devido a sua atuação como precursores de vitamina A e de compostos retinóicos essenciais (Gallagher, 2004).

Estes compostos encontram-se em concentrações relativamente altas no milho, com cerca de 11 mg de carotenóides kg<sup>-1</sup> em base seca (Panfili *et al.*, 2004), diferenciando-se ainda de outros cereais por sua distribuição mais uniforme dentro do endosperma (Gallagher, 2004). A luteína, em específico, é um dos carotenóides encontrados majoritariamente no milho (de Oliveira e Rodriguez-amaya, 2007), tendo ganhado destaque devido a sua essencialidade e associação com a saúde ocular, atuando na proteção dos olhos contra os radicais livres e os comprimentos de luz azul do ultravioleta próximo (Mrcophth *et al.*, 2008).

Apesar das investigações em curso, e de novas descobertas que aumentam o entendimento sobre os processos metabólicos de síntese e acúmulo de carotenóides (Li *et al.*, 2007), existem ainda muitas lacunas a respeito da expressão de enzimas relacionadas e dos locais em que estas atuam. Como resultado, os esforços para implantar melhorias no conteúdo ou composição de carotenóides, quer por cruzamento ou engenharia genética, tem apresentado limitações (Gallagher, 2004).

Neste contexto, as variedades crioulas de milho apresentam grandes diferenças moleculares, as quais se relacionam diretamente com sua capacidade antioxidante (Hu *et al.*, 2003). Estas fontes de variabilidade genética podem ser exploradas contribuindo no melhoramento de variedades comerciais, e no incremento na qualidade nutricional e funcional desses grãos, uma exigência cada vez maior dos mercados consumidores (Altieri, 2002).

Tendo em vista o exposto, objetivamos neste trabalho avaliar onze variedades crioulas em relação à expressão gênica diferencial do gene *lut1*, o qual codifica para a enzima carotenóide  $\epsilon$ -hidroxilase, responsável pela síntese do carotenóide luteína em grãos de milho.

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

### 2.1 Cultivo das variedades de milho crioulo

As variedades de milho crioulo do Banco de germoplasma da Embrapa Clima Temperado foram cultivadas a campo em parcelas separadas sendo as espigas cobertas e a polinização realizada manualmente. A nomenclatura utilizada para cada variedade de milho crioulo e sua coloração foram as seguintes: Roxo Índio (roxo), Amarelão (laranja), Dente de ouro roxo (roxo), Farináceo branco (branco), Cabo roxo (roxo alaranjado), Dente de ouro (amarelo), Farináceo amarelo (amarelo claro), Sertanejo (amarelo), Preto (preto), Argentino (alaranjado), Ferro (amarelo).

### 2.2 Coleta e armazenamento das amostras

As espigas de milho foram coletadas 25 dias após a polinização das espigas, quando os grãos encontravam-se plenamente formados e com umidade entre 72 e 80%. As espigas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises.

### 2.3 RT-PCR

Todos os materiais foram previamente tratados com inibidor de RNase (RNase Away – Invitrogen<sup>TM</sup>). As espigas de milho foram debulhadas e os grãos macerados com auxílio de nitrogênio líquido. A extração de RNA total foi realizada pelo método do CTAB com modificações (Chang *et al.*, 1993), sendo sua qualidade avaliada por espectrofotometria (relação DO260/280) e por eletroforese em gel de agarose 1%. A concentração foi calculada utilizando a fórmula:  $[\text{RNA}] = 40\text{ug/mL} \times \text{fator de diluição} \times \text{A260}$ .

A partir de 75ng de RNA total foi realizada a digestão com 1U DNase e 1 $\mu\text{L}$  10x DNase I Reaction Buffer, e posteriormente a síntese de cDNA com a enzima M-MLV (conforme fabricante Invitrogen<sup>TM</sup>). Após sintetizados, os cDNAs foram amplificados em PCR semi-quantitativa. As condições da reação de PCR foram otimizadas conforme segue: volume final de 25  $\mu\text{L}$  contendo 1 $\mu\text{L}$  cDNA, 0,2 mM dNTP, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 pmol de cada *primer*, 2U de *Taq* DNA polimerase e 1x tampão da enzima. A amplificação foi realizada em termociclador Gene Amp 9700 (Applied Biosystems<sup>TM</sup>), utilizando as seguintes condições: 2' a 95  $^{\circ}\text{C}$  seguido por 35 ciclos de 60" a 95  $^{\circ}\text{C}$ , 60" a 60  $^{\circ}\text{C}$  e 60" a 72  $^{\circ}\text{C}$  e a extensão final de 7' a 72  $^{\circ}\text{C}$ . Os *primers* para a sequência do gene *gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (gli)*, utilizado como controle positivo de reação, e do gene *lut*, foram construídos com auxílio do programa *Primer Express* (Applied Biosystems), a partir de sequências de milho e arroz, respectivamente, obtidas no *NBCI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os produtos da *PCR* foram analisados em gel de agarose 3%, corado em brometo de etídeo e visualizado em transluminador UV.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

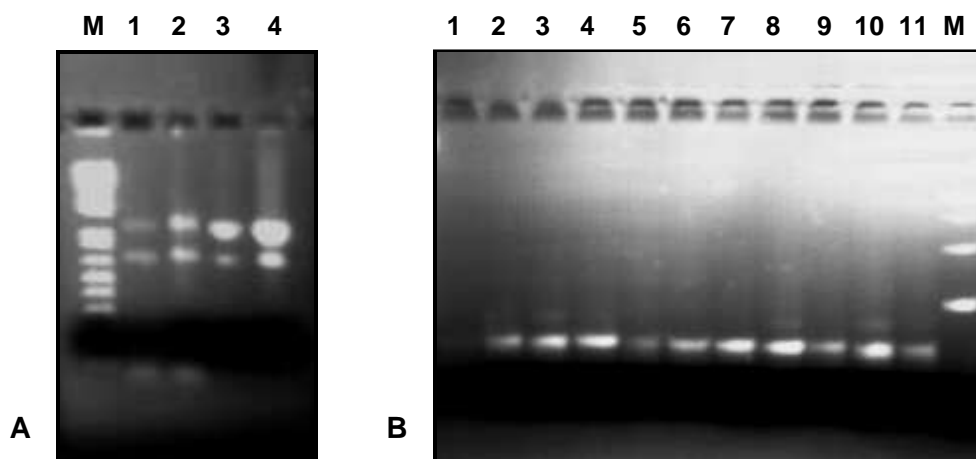
A divulgação de inúmeros estudos mostrando os efeitos benéficos à saúde proporcionados pela ingestão de compostos funcionais, entre os quais a luteína, presente majoritariamente nos grãos de milho, tem estimulado cada vez mais a

avaliação das diferenças de expressão gênica em diversas culturas e situações, visando alcançar novos níveis de entendimento acerca de mecanismos regulatórios e rotas bioquímicas, permitindo assim a obtenção de alimentos com maior qualidade nutricional com foco na manutenção da saúde (Li *et al.* 2008; Vallabhaneni e Wurtzel, 2009).

Em virtude disto, várias técnicas de extração de RNAs em milho têm sido desenvolvidas, buscando obter RNA de alta qualidade, já que a pureza e a integridade do RNA são elementos cruciais para estudos de expressão gênica (Fleige e Pfaffl, 2006). Porém, não existe até o momento nenhum kit específico para extração de RNA de grãos. Assim, este trabalho propôs a otimização da extração de RNA oriundo de grãos de diferentes variedades de milho crioulo e utilização deste RNA para avaliação da transcrição do gene *lut1*, que codifica para uma enzima chave na síntese de luteína.

Devido à instabilidade inerente do RNA e à ubiquidade de ribonucleases, precauções metodológicas estritas foram necessárias durante a extração, tais como manutenção da amostra a temperaturas baixas e utilização de inibidor de RNase em todos materiais manipulados durante o processo de extração. Além disso, carboidratos e proteínas presentes em grandes quantidades nestes grãos podem coprecipitar com o RNA devido suas propriedades físico-químicas similares, afetando a quantidade e a qualidade das amostras. Por isso, após testes preliminares com diferentes métodos de extração (dados não publicados), padronizamos a utilização do método de extração de RNA proposto por Chang *et al.* (1993), com algumas alterações, o qual permite a separação dos açúcares presentes nas amostras utilizando precipitação com cloreto de lítio, seguido de centrifugação. Desta forma, foi possível a obtenção, em todas as amostras, de RNA com alta qualidade, com *ratios* (260/280nm) entre 1,8 e 2,2 e em quantidades suficientes para análise da expressão gênica. Estes RNAs também apresentavam-se íntegros, resultado este confirmado através de migração em gel de agarose (Figura 1 A).

Após otimização das condições de extração de RNA, os mesmos foram utilizados para síntese de cDNA para posterior verificação da reprodutibilidade da expressão do gene *gli* (controle positivo) e avaliação dos transcritos do gene *lut1*, através da técnica de RT-PCR semi-quantitativa. A utilização do conjunto de *primers* desenhado para este estudo propiciou o aparecimento de apenas uma banda específica de aproximadamente 80 pb para a *lut1* (Figura 1B).



**Figura 1.** A - Gel de agarose 1,2% demonstrando a extração de RNA de grãos de diferentes variedades de milho crioulo. M- marcador 1kb *pluss*. B – Gel de agarose 2% apresentando a expressão do gene *lut*, através de RT-PCR semi-quantitativa, em grãos de diferentes variedades de milho crioulo. 1- Preto, 2- Dente de ouro, 3- Argentino, 4- Roxo índio, 5- Sertanejo, 6- Cabo roxo, 7-

Ferro, 8- Amarelão, 9- Dente de ouro roxo, 10- Farináceo amarelo, 11- Farináceo branco, M- marcador 100pb.

Todas as variedades crioulas apresentaram expressão desse gene, indicando haver síntese do carotenóide luteína diretamente no interior do grão em sua etapa final de formação, sendo esta bastante diferenciada, podendo-se destacar as variedades, Roxo índio, Ferro, Amarelão, Farináceo amarelo como as que tiveram maiores expressões desse gene. Não se observou num primeiro momento correlações positivas com características fenotípicas desses grãos.

Diante dos resultados obtidos, ensaios de quantificação transcricional em Real-time PCR serão realizados utilizando os *primers* que amplificam esta enzima chave da síntese de luteína, bem como de outras enzimas pertencentes à rota metabólica de carotenóides, a fim de mensurar com confiabilidade esta diferença de expressão gênica.

#### 4 CONCLUSÃO

Observou-se expressão do gene *lut1* no grão de milho sendo esta diferenciada entre as variedades de milho crioulo estudadas, justificando a realização de ensaios quantitativos para sua confirmação.

#### 5 REFERÊNCIAS

1. ALTIERI, M. A. **Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável**. Guaíba: Editora Agropecuária. p. 592, 2002.
2. CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**. v.11, p.113-116. 1993.
3. DE OLIVEIRA, G.P.R., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Processed and prepared corn products as sources of lutein and zeaxanthin: Compositional variation in the food chain. **Journal of Food Science**. V. 72, p. 79, 2007.
4. FLEIGE, S.; PGAGGL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**. v.27, p.126–139, 2006.
5. GALLAGHER, C. E., MATTHEWS, P. D., FAQIANG, L., WURTZEL, E. T. Gene Duplication in the Carotenoid Biosynthetic Pathway Preceded Evolution of the Grasses. **Plant Physiology**. V. 135, p. 1776–1783, 2004.
6. HU, C., ZAWISTOWSKI, J., LING, W., KITTS, D.D. Black rice (*Oryza sativa* L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 51, p 5271-5277, 2003.
7. LI, W.D., WEI, C.L., WHITE, P.J., BETA, T. High-amylose corn exhibits better antioxidant activity than typical and waxy genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 291-298, 2007.
8. LI, F., VALLABHANENI, R., WURTZEL, E. T. PSY3, a New Member of the Phytoene Synthase Gene Family Conserved in the Poaceae and Regulator of Abiotic Stress-Induced Root Carotenogenesis. **Plant Physiology**. v. 146, p. 1333–1345, 2008.
9. MRCOPHTH, E. L., NOLAN, J. M., O'DONOVAN, O., BHOSALE, P., BERNSTEIN, P. S., BEATTY, S. Transport and Retinal Capture of Lutein and Zeaxanthin with Reference to Age-related Macular Degeneration. **Survey of Ophthalmology**. V. 53, n. 1, 2008.

10. PANFILI, G., FRATIANNI, A., IRANO, M. Improved normal-phase high-performance liquid chromatography procedure for the determination of carotenoids in cereals. **Public Health Nutrition**. V. 52, p. 6373-6377, 2004.
11. PAES, M. C. D. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária (EMBRAPA Milho e Sorgo). **Circular Técnica**, 75. 2006.
12. VALLABHANENE, R.; WURTZEL, E. Timing and biosynthetic potential for carotenoid accumulation in genetically diverse germplasm of maize. **Plant Physiology Preview**. In press. DOI:10.1104/pp.109.137042, 2009.