



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

TERPENOS SINTASES DE CITROS

Thaís Regina Tritapepe **Sakamoto**^{1,2,a}, Kleber Martins **Borges**^{2,b}, Marco Aurélio **Takita**^{2,c}

¹Universidade Federal de São Carlos/ Campus Araras; ²Instituto Agrônomo de Campinas, Laboratório de Biotecnologia/ Centro de Citricultura Sylvio Moreira

Nº 13138

RESUMO - Os 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 afetam a qualidade dos frutos, pois o aroma e sabor são diretamente influenciados por compostos presentes no óleo essencial de citros. Entretanto, o melhoramento clássico visando o aprimoramento destes dois tratos são extremamente complicados e de difícil execução. Assim, o entendimento dos processos que determinam a qualidade dos óleos essenciais de plantas, de modo geral, e de citros é fundamental para o desenvolvimento de ferramentas que possibilitem uma agilidade maior na produção de plantas melhoradas, seja por cruzamentos clássicos ou por engenharia genética pelo processo de engenharia metabólica. Assim, a partir de estudos anteriores, tendo em posse as sequências dos genes que codificam terpeno sintases, foram desenhados primers, usados na amplificação das regiões codificadoras dos genes, a partir dos clones disponíveis no banco de clones do IAC e submetidos à minipreparações de plasmídeos. Estes DNAs foram clonados em vetor de expressão. As transformações foram plaqueadas e 6 colônias foram escolhidas de cada gene, onde foram submetidos a minipreparações de plasmídeos e amplificação, apresentando o resultado esperado, assim os clones poderão ser usados na realização de trabalhos funcionais.

Palavras-chaves: Terpenos sintases, citros, óleo essencial.

^a Bolsista CNPq: Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, thais_r_sakamoto@hotmail.com, ^bColaborador, kleber@centrodecitricultura.br, ^cOrientador: Pesquisador, takita@centrodecitricultura.br



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

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. So, from previous studies, 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. These DNAs were cloned into the expression vector. The transformations were plated and 6 colonies were selected of each gene, where were submitted to amplification and miniprep plasmid, showing the expected results, thus the clones may be used for functional studies.*

Keywords: Terpene synthases, citrus, essential oil.

1 INTRODUÇÃO

O Laboratório de Biotecnologia de Citros do Centro APTA Citros "Sylvio Moreira" do Instituto Agrônomo 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.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

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 tratamentos 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.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi a clonagem dos genes codificando terpeno sintases, identificados no genoma de citros, em vetor de expressão, seguido da expressão dos genes em *Escherichia coli*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extração de RNA Total com Trizol

Foi retirada a casca do fruto e macerada com nitrogênio líquido. Separou-se 0,1g do tecido triturado e adicionou-se 100 µL de trizol. Foi misturado por inversão e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Foi Homogeneizado no vortex e centrifugado por 10 minutos a 4 °C a 12000 rpm e transferido o sobrenadante para um novo tubo. Posteriormente foi adicionado 200µL de clorofórmio 100% e homogeneizado vigorosamente por inversão por 15 segundos e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Centrifugou-se a 12000 rpm a 4°C por 10- 15 minutos e transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo e adicionou-se 500µL de isopropanol 100%, misturando com auxílio do vortex por 10 segundos, e incubando-se em temperatura ambiente por 10 minutos. Centrifugou-se a 12000 rpm por 8 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante e, para lavar posteriormente, adicionou-se 1mL de etanol 70%, diluído em água tratada com 0,1% dietil-pirocarbonato (DEPC), centrifugando-se a 9000 rpm a 4°C por 5 minutos. Removeu-se o etanol e deixou-se secar o coletado em temperatura ambiente. Finalmente ressuspendendo-se em 100 µL de água DEPC. O RNA obtido foi armazenado em freezer a temperatura de -80°C.

2.2 Extração Síntese de cDNA (thermo Scientific- RevertAid)

Para a síntese de cDNA foram adicionados 5µL de RNA em uma concentração de aproximadamente 300 µg/µL, 0,5 µg de OligoDT (0,5 µg/µL) e 6µL de água, totalizando um volume final de 12 µL. Homogeneizou-se por 10 segundos na centrífuga e incubou-se a 65°C por 5



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

minutos, o tubo foi então incubado em gelo por 3 minutos. Sequencialmente adicionou-se 4 μL de 5x Reaction Buffer, 1 μL de RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μL), 2 μL de 10mM dNTP Mix e 1 μL de RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/ μL), totalizando assim 20 μL de reação, que foi misturada e centrifugada, colocando-se as amostras no termociclador, com ciclo de 60 minutos a 42°C, 5 minutos a 70°C, com a temperatura da tampa entre 55- 65°C.

As amostras obtidas foram utilizadas em reações de polimerização em cadeia (PCR), onde foram utilizados 1 μL do cDNA obtido, 2,5 μL de 5x Buffer, 3 μL MgSO_4 , 2,5 μL de dNTP mix, 1,0 μL de primer forward e 1,0 μL de primer reverse específicos, 0,625 μL de *Pfu* DNA polimerase (Thermo) e 13,375 μL de água Mili-Q autoclavada. As condições de ciclicização foram: um passo inicial de 3 minutos a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 4 minutos a 72°C, e um passo final de incubação a 72°C por 1 minuto, finalizando a 4°C.

2.3 Digestão para clonagem (Promega)

A expressão foi idealizada para ser feita através da utilização do Flexi Vectors Systems (Promega). Para tanto, realizou-se a digestões em 2 reações, onde a primeira era composta de 4 μL de 5x Flexi Digest Buffer, 12 μL de produto purificado de PCR e 4 μL de Flexi enzyme Blend, totalizando 20 μL . A reação 2 continha: 12 μL de Nuclease-Free Water, 4 μL de 5x Flexi Digest Buffer, 2 μL de pF1K T7 Flexi® Vector (200ng) e 2 μL de Flexi Enzyme Blend, totalizando 20 μL . As duas reações foram incubadas a 37°C por 30 minutos e para inativar a reação 2, incubou-se por 20 minutos a 65°C, prosseguindo-se com a ligação.

2.4 Ligação

Para fazer a ligação foram utilizados 10 μL de 2x Flexi Ligase Buffer, 5 μL de Solução 2, 4 μL de Solução 1 e 1 μL de T4 DNA Ligase (HC), totalizando 20 μL . Foram incubados a temperatura ambiente por 1 hora. Seguiu-se com a transformação.

2.5 Transformação

As células competentes armazenadas a -80°C, foram descongeladas em gelo, adicionando-se 5 μL da ligação a 100 μL de célula competente. Foi feita uma incubação por 30 minutos no gelo, procedendo-se um choque térmico por 90 segundos à 42°C e, posteriormente, as células foram deixadas por mais 2 minutos em gelo. Adicionou-se 1 mL do meio SOC (2% triptona, 0.5% extrato de levedura, 10 mM cloreto de sódio, 2,5 mM cloreto de potássio, 10 mM cloreto de magnésio, 10



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

mM sulfato de magnésio, 20 mM glicose), incubando-se por 1 hora no shaker a 250 rpm, 37°C. Foram plaqueados 100 µL da transformação em meio LB com Kanamicina (30 µg/mL). O restante da transformação foi centrifugada por 10 segundos e o sobrenadante descartado. O coletado foi ressuspensionado e plaqueado em meio LB com Kanamicina.

2.6 Minipreparação para extração do DNA plasmidial e amplificação

Seis colônias dos transformantes de cada gene foram crescidas em meio LB líquido com Kanamicina a 37°C durante a noite. Foram pipetados 1 mL de cada transformante em microtubos de 1,5 mL, centrifugando-se por 1 minuto a 12.000 rpm e retirando-se o sobrenadante. As bactérias coletadas foram ressuspensionadas em 100 µL de Solução I (50 mM glicose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0, Água), onde foram ressuspensionadas em vortex. Em seguida foram adicionados 200 µL de Solução II (1 N NaOH, SDS 10%), invertendo-se o tubo várias vezes, ao qual adicionou-se 150 µL de 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 gentilmente e levada para centrifugação por 2 minutos em temperatura ambiente, transferindo-se o sobrenadante para outro microtubo. O DNA foi purificado usando-se 400 µL da Miniprep Express™ Matrix (QBio), conforme instrução do fabricante. O DNA foi obtido em um volume final de 100 µL.

As amostras obtidas foram utilizadas em reações de polimerização em cadeia (PCR), onde foram utilizados além de 1 µL do DNA obtido, 2,5 µL de 10x Pfu Buffer, 3 µL MgSO₄, 2,5 µL de dNTP mix, 1,0 µL de primer forward (5 pmol) e 1,0 µL de primer reverse (5 pmol) específicos, 0,625 µL de Pfu DNA polimerase (Thermo) e 13,375 µL de água Mili-Q autoclavada. As condições de ciclagem foram: um passo inicial de 3 minutos a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 4 minutos a 72°C, e um passo final de incubação a 72°C por 1 minuto, finalizando a 4°C.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De posse das sequências dos genes que codificam terpeno sintases a partir dos trabalhos realizados anteriormente, foram desenhados primers para amplificação de alguns deles (Tabela 1).

Tabela 1. Primers utilizados na amplificação de genes que codificam terpeno sintases.

Primer	Sequência
Seq_25_C_FOR	TGCGATCGCCATGGATCTTAAGAGTCTTCCATCTTC



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Seq_25_C_REV	AGTTTAAACCATGGGAAGAGGATCAACA
Seq_33_C_FOR	TGCGATCGCCATGTCTGATGCCGATAAACCTG
Seq_33_C_REV	AGTTTAAACGAGCTTAATGGGGTCCCTCAG
Seq_34_C_FOR	TGCGATCGCCATGCTAGCAACGGTTTCCAGTTCA
Seq_34_C_REV	AGTTTAAACAGTGACAGGGTCTCTGAGCA
Seq_40_C_FOR	TGCGATCGCCATGTCGTCCTACTGCAGATTTCC
Seq_40_C_REV	AGTTTAAACAAATGGAACGTGGTCTCC

Assim, após extração do RNA do fruto, fez-se a síntese de cDNA para, em seguida, fazer a amplificação e clonagem para transformação de *Escherichia coli*. Para identificar se a síntese havia funcionado, fez-se uma amplificação seguida de separação de DNA em eletroforese (Figura1).

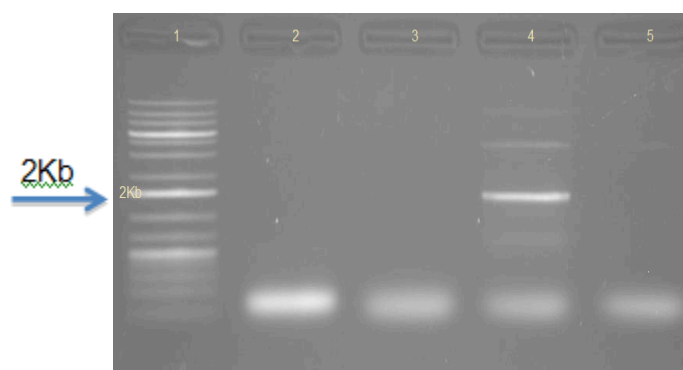


Figura 1. Gel de agarose 1% para verificação da Síntese de cDNA. 1: Marcador GeneRuler 1Kb Plus DNA (Fermentas) ; 2 a 5: Testes da síntese de cDNA.

Observou-se então que o cDNA 4 poderia ser utilizado para a clonagem, entretanto, não foi possível prosseguir pois os genes desejados no trabalho apresentavam pouca ou nenhuma expressão em fruto, o que foi verificado pela ausência de amplificação com os primers (dados não mostrados). Então, para dar continuidade ao trabalho, os primers desenhados 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.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

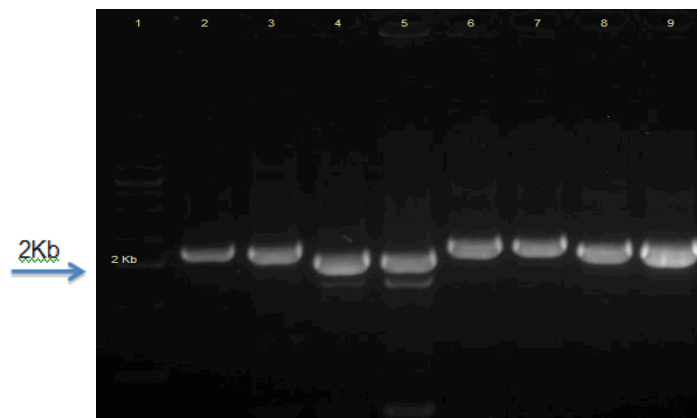


Figura 2. Gel de agarose 1% da amplificação do DNA plasmidial. 1: Marcador GeneRuler 1Kb Plus DNA (Fermentas) ; 2 e 3: Amplificação após minipreparação, com Primers Seq_34_C_FOR e Seq_34_C_REV; 4 e 5: Amplificação após minipreparação, com Primers Seq_33_C_FOR e Seq_33_C_REV; 6 e 7: Amplificação após minipreparação, com Primers Seq_25_C_FOR e Seq_25_C_REV; 8 e 9: Amplificação após minipreparação, com Primers Seq_40_C_FOR e Seq_40_C_REV.

Os amplicons apresentaram tamanhos entre 1,8 e 2,2 Kb, que é exatamente o que se esperava para o trabalho.

Estes DNAs foram clonados diretamente em vetor de expressão. Para tanto, foram feitas a digestão dos fragmentos e do vetor pF1K T7 Flexi®, seguido de ligação e transformação de *E. coli*. Dos transformantes obtidos, selecionou-se seis clones, com os quais fez-se minipreparações de plasmídeos. Estes DNAs foram usados para amplificação das sequências codificadoras com os primers de interesse. Os resultados podem ser observados na figura 3.

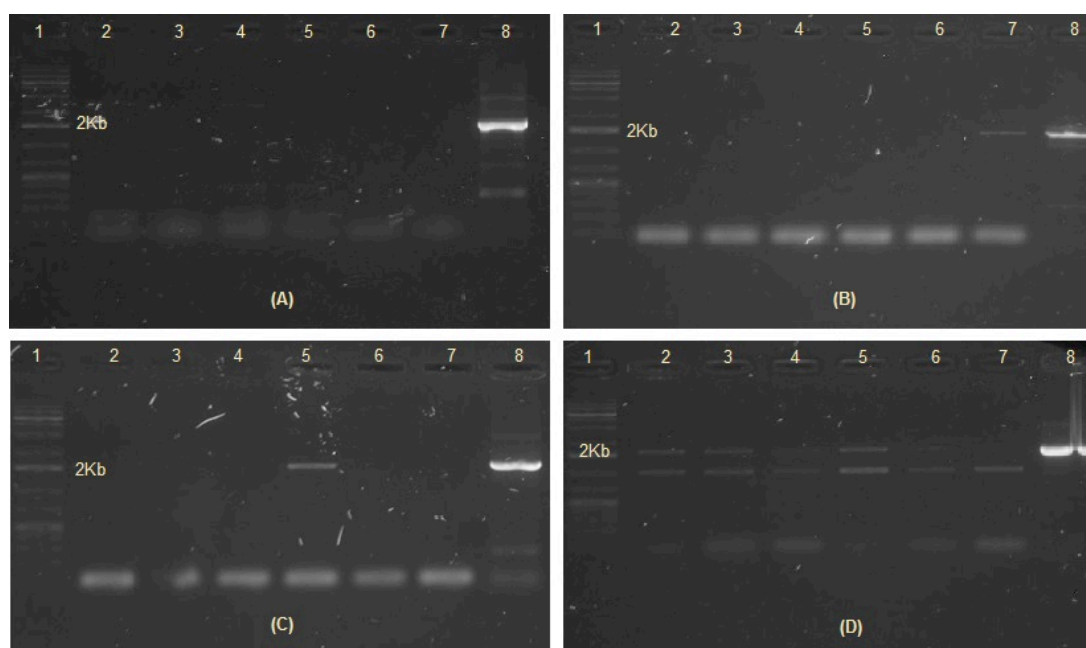




Figura 3. Gel de agarose 1% da amplificação após minipreparação, com Primers específicos, do DNA plasmidial das colônias. 1: Marcador GeneRuler 1Kb Plus DNA (Fermentas); 2 a 7: Colônias de 1 a 6; 8: Amplificação da miniprep do DNA plasmidial após minipreparação. (A) Amplificação após minipreparação com primers Seq_34_C_FOR e Seq_34_C_REV; (B) Amplificação após minipreparação com primers Seq_33_C_FOR e Seq_33_C_REV; (C) Amplificação após minipreparação com primers Seq_25_C_FOR e Seq_25_C_REV; (D) Amplificação após minipreparação com primers Seq_40_C_FOR e Seq_40_C_REV.

Estes plasmídeos contendo os genes codificadores de terpeno sintases estão sendo transferidos para a linhagem de *E. coli* BL21 DE para produção da proteína.

4 CONCLUSÃO

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

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida. Ao IAC, pela oportunidade de estágio.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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., Mazon, 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.