

**THAÍSA TESSUTTI PINHEIRO**

**Análise da expressão de genes associados à via de biossíntese de ácidos graxos em**

*Theobroma cacao* e ao acúmulo de ácido esteárico

**Dissertação apresentada ao Centro de  
Energia Nuclear na Agricultura,  
Universidade de São Paulo, para obtenção do  
título de Mestre em Ciências**

**Área de concentração: Biologia na  
Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de  
Oliveira Figueira**

**PIRACICABA**

**2009**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Pinheiro, Thaísa Tessutti

Análise da expressão de genes associados à via de biossíntese de ácidos graxos em *Theobroma cacao* e o acúmulo de ácido esteárico / Thaísa Tessutti Pinheiro; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Piracicaba, 2009.

121 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Cacau 2. Expressão gênica 3. Lipídeos 4. Metabolismo de gordura  
5. RT-qPCR I. Título

CDU 577.125:575.117

*Aos meus pais Dorival e Marilda e a minha irmã Renata, pelo amor, apoio e pela confiança  
sempre depositada em mim*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, saúde e por toda a luz,

Ao prof. Dr. Antonio Figueira pela orientação e crescimento científico proporcionado;

A Dra. Maria Lorena Sereno por toda ajuda, acessibilidade e atenção;

A aluna Déborah Sanae Nishimura pelo auxílio em muitos momentos da minha pesquisa e principalmente pela amizade;

Ao Dr. Gildemberg Leal Júnior pelas orientações recebidas;

Ao Dr. Paulo Albuquerque pela atenção e contribuição com os frutos de cacau junto a CEPLAC;

Aos técnicos Wlamir Godoy, Eduardo Fonseca e Raquel Orsi pela amizade e cooperação;

Às técnicas Maria Antonia Ladalardo Etchegaray e Carolina Galafasi Pereira, do Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal - ESALQ/USP, pelo auxílio na obtenção e análise do perfil de ácidos graxos;

Aos secretários da Pós-Graduação do CENA/USP: Cláudia Corrêa, Neuda Oliveira, Sônia de Campos e Fábio Oliveira; e a bibliotecária Marília Henyei;

A Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) por disponibilizar os frutos de *Theobroma cacao*;

A Prof<sup>a</sup> Dr. Sui Mui Tsai, do Laboratório de Biologia celular e Molecular do CENA/USP pelo auxílio no sequenciamento das amostras;

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo;

Aos meus pais Dorival e Marilda pelo carinho, amor e apoio em todos os momentos e a minha irmã Renata pela grande amizade;

Ao meu namorado Tiago Carletti, por tanto amor, conforto e alegrias sempre;

Aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Melhoramento de Plantas: Aline Possignolo, Celso Gaspar, Danielle Scotton, Déborah Sanae Nishimura, Eduardo Bressan, Felipe Campana, João Felipe Oliveira, João Fernando Bortoleto, Joice Banim, Layanne Souza, Lígia Santos, Matheus Mariotti, Raul Santin, Paula Yamamoto, Renato Ferreira, Onildo Nunes, Tais Tomazin; pela troca de experiências, convívio, amizade e principalmente por tornarem minha pós-graduação muito mais feliz!

## RESUMO

PINHEIRO, T. T. Análise da expressão de genes associados à via de biossíntese de ácidos graxos em *Theobroma cacao* e ao acúmulo de ácido esteárico. 2009. 121 f. Dissertação (mestrado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

As sementes do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) constituem a única fonte de manteiga de cacau, matéria prima fundamental para as indústrias de chocolates e confeitos, farmacêutica e cosmética. Cerca de 50 % do peso seco das sementes é composto por gordura, caracterizada pelo alto nível de estearato (30-37%), em combinação com palmitato (24-31%) e de oleato (33-39%), conferindo-lhe uma composição triglicéridica única, responsável pelas suas propriedades de fusão, com aplicações específicas e especiais. Apesar dos genes que codificam as enzimas da via metabólica de biossíntese de ácidos graxos e triglicérides em plantas serem conhecidos, os mecanismos moleculares pelos quais as plantas controlam a produção de estearato e que diferenciam as plantas acumuladoras de estearato de todas as demais não estão claramente definidos. O objetivo deste trabalho foi analisar a composição de ácidos graxos nos frutos de *Theobroma cacao* e a expressão temporal de genes relacionados à via metabólica de ácidos graxos e triglicérides durante o desenvolvimento de sementes de *T. cacao*, com ênfase na acumulação de estearato. Em paralelo, foram eleitos os genes referências mais estáveis para os estudos em embriões e diversos tecidos de *Theobroma cacao*. Empregando-se a técnica de reação quantitativa da amplificação em cadeia de transcritos reversos de RNA (RT-qPCR), foram analisadas a expressão dos genes codificadores da proteína carregadora de acil A, B e C,  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II,  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase A e B, Acil-ACP tioesterase A, acil-ACP tioesterase B, acil-CoA sintetase A e B e da proteína oleosina. Quando se estudou de expressão gênica apenas nos embriões de *T. cacao*, os três genes mais estáveis foram proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil A e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. Quando se considerou diversos tecidos de plantas de *Theobroma cacao*, os melhores genes para a normalização dos valores de expressão foram os codificadores da proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil B e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. A acumulação de transcritos da  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase foi relacionada ao aumento do ácido oleico. O aumento na quantidade deste ácido acontece pela ação conjunta da  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase, e acil-ACP tioesterase A, a qual

mostra maiores níveis de transcritos entre 90 e 140 DAP com pico aos 100 DAP. O aumento de ácidos esteárico estaria relacionado com a ação conjunta e com transcrição temporalmente coordenada dos genes das enzimas  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II, Acil-ACP tioesterase A e Acil-ACP tioesterase B. Transcritos da enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II apresenta pico aos 100 DAP, possivelmente com acúmulo máximo de substratos 18:0-ACP, que poderiam ser hidrolizado preferencialmente pela enzima acil-ACP tioesterase A, ou acil-ACP tioesterase B, O intervalo entre o pico de acúmulo de transcritos entre  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II (100 DAP) e Acil-ACP tioesterase A e  $\Delta^9$  estearoil-ACP desaturase (110 DAP) sugere que poderia ocorrer um acúmulo de estearato resultante da ação dessas enzimas. Esses resultados corroboram o modelo de acumulação de estearato proposto por Silva (2005).

Palavras-chave: cacau, expressão gênica, RT-qPCR, biossíntese ácidos graxos

## ABSTRACT

PINHEIRO, T. T. Expression analysis of genes associated with the fatty acid biosynthetic pathway in *Theobroma cacao* and with the accumulation of stearic acid. 2009. 121 f. Dissertação (mestrado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

Cacao seeds (*Theobroma cacao* L.) are unique sources of cocoa butter, fundamental raw material for the chocolate, confectionary, cosmetic and pharmaceutical industries. Around 50% of the seed dry weight represents fat, characterized by the high levels of stearate (30-37%), in combination of palmitate (24-31%) and oleate (33-39%), giving a unique triacylglycerol composition, responsible for the melting profile for special and specific applications. Despite the fact that genes encoding enzymes of the fatty acid and triglyceride biosynthetic pathway of plants are known, the mechanisms to control the accumulation of high levels of stearate, that differ from other species, are not clearly defined. The objective of this work was to analyse the composition of fatty acids and the expression of genes associated with fatty acid and triglyceride biosynthetic pathway during the development of cacao pods, with emphasis with stearate accumulation. In parallel, the establishment of stable reference genes to investigate gene expression in developing embryos and other cacao tissues were investigated. Using the quantitative amplification of reversed transcripts (RT-qPCR), the expression of genes coding for the acyl-carrier protein A, B and C;  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase II;  $\Delta^9$ stearoyl-ACP desaturase A and B; Acyl-ACP thioesterase A; Acyl-ACP thioesterase B; Acyl-CoA synthetase A and B; and oleosin. When gene expression was conducted only in developing cacao embryos, the three most stable genes were the ribosomal protein L35, acyl-carrier protein A and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. When various tissues were considered, the best reference genes for gene expression normalization were those encoding for the ribosomal protein L35, acyl carrier protein B and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. The accumulation of  $\Delta^9$ stearoyl-ACP desaturase transcripts could be associated with the accumulation of oleate, together with the increase of acyl-ACP thioesterase A, with increased relative levels of transcripts between 90 and 140 DAP, peaking at 100 DAP. The increase in stearate might result from the joint activity of the  $\Delta^9$ stearoyl-ACP desaturase and acyl-ACP thioesterase A, which presented higher accumulation of transcripts between 90 and 140 DAP, with peak at 110 DAP. The increase in stearate would



associated with the joint and temporal coordinated expression of genes encoding  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase II, and Acyl-ACP thioesterase A and B. Transcripts of the enzyme  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase II peaked at 100 DAP, possibly with the maximum accumulation of substrates 18:0-ACP, that would be preferentially hydrolyzed by the enzyme acyl-ACP thioesterase A, or acyl-ACP thioesterase B. The gap between the peak in transcript accumulation between  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase II (100 DAP) and acyl-ACP thioesterase A and  $\Delta^9$ stearoyl-ACP desaturase (110 DAP) could lead to the accumulation of stearate. These results corroborated the model proposed by Silva (2005).

Key-words: cocoa, gene expression, RT-qPCR, fatty acids biosynthesis

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16:0	ácido palmítico
16:0-ACP	palmitoil-ACP
18:0	ácido esteárico
18:0-ACP	estearoil-ACP
18:1	ácido oleico
18:1-ACP	oleoil-ACP
18:2	ácido linoleico
20:1	ácido gadoleico
ACP A	Proteína carregadora de acil A
ACP B	Proteína carregadora de acil B
ACP C	Proteína carregadora de acil C
ACS A	acil-CoA sintetase A
ACS B	acil-CoA sintetase B
BLAST	alinhamento local de seqüências ( <i>Basic Local Alignment Sequence Tool</i> )
cDNA	DNA complementar ao mRNA
CTAB	brometo de hexadiltrimetilamônio
DAP	dias após a polinização
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	N-desoxinucleótideo trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EST	Etiqueta de seqüência expressa ( <i>Expressed Sequence tag</i> )
Fat A	Acil-ACP tioesterase A
Fat B	Acil-ACP tioesterase B
KAS II	$\beta$ -cetoacil-ACP sintase II
OLEO	Oleosina
PCR	reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	transcrição reversa seguida de PCR
RT-qPCR	transcrição reversa seguida de PCR quantitativo em tempo-real
SAD A	$\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase A

SAD B	$\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase B
SB	tampão ácido bórico – sódio ( <i>Sodium Boric Acid</i> )
SDS	dodecil sulfato sódico ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
<i>T. cacao</i>	<i>Theobroma cacao</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

ton	tonelada
pb	pares de bases
°C	graus Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
L	litro
g	grama
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
seg	segundo
<i>g</i>	constante gravitacional
h	hora
nm	nanômetro
mM	milimolar
µM	micromolar
ng	nanograma
U	unidade de enzima (Weiss)
M	molar
cm	centímetro
%	por cento
V	volts

# SUMÁRIO

Página

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1 Importância econômica do gênero <i>Theobroma</i> .....	19
2.2 Ácidos graxos e triglicerídeos em sementes de cacau.....	20
2.3 Alterações na composição de ácidos graxos e triglicerídeos durante o desenvolvimento de sementes de cacau .....	21
2.4 Biossíntese de ácidos graxos em plantas .....	22
2.5 Biossíntese e empacotamento de triglicerídeos em plantas.....	23
2.6 Desenvolvimento e produção de triglicerídeos nas sementes de cacau .....	25
2.7 Plantas acumuladoras de estearato .....	25
2.8 Recursos genômicos para o cacau.....	28
2.9 Amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) e genes referência .....	29
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
4.1 Material vegetal.....	32
<b>4.1.1 Sementes de <i>T. cacao</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.2 Tecidos de <i>T. cacao</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>4.2 Identificação de genes associados à via metabólica de biossíntese de ácidos graxos..</b>	<b>33</b>
<b>4.2.1 Busca das sequências.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2.2 Construção dos iniciadores.....</b>	<b>33</b>
4.3 Extração de RNA.....	34
<b>4.3.1 Extração de RNA de sementes de <i>T. cacao</i>.....</b>	<b>34</b>

<b>4.3.2 Extração de RNA de diversos tecidos de <i>T. cacao</i></b> .....	<b>35</b>
4.4 Quantificação e análise da integridade do RNA total .....	36
4.5 Tratamento com DNase.....	37
4.6 Síntese de cDNA .....	38
4.7 Confirmação da eficiência da síntese .....	37
4.8 Clonagem e sequenciamento .....	38
4.9 Minipreparação do DNA plasmidial .....	39
4.10 Sequenciamento dos fragmentos .....	39
4.11 Extração de DNA genômico.....	40
4.12 Amplificação dos cDNAs e DNA genômico.....	41
4.13 Amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR).....	41
4.14 Seleção dos genes referência .....	43
4.15 Extração e metilação de ácidos graxos.....	43
4.16 Análise por Cromatografia Gasosa.....	44
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
5.1 Identificação de genes associados à via metabólica de biossíntese de ácidos graxos do cacaueiro.....	46
5.2 Construção dos iniciadores.....	51
5.3 Extração, quantificação e análise de RNA .....	52
5.4 Seleção de genes referência.....	56
5.5 Caracterização do perfil de ácidos graxos dos frutos de <i>Theobroma cacao</i> .....	64
5.6 Determinação da eficiência dos iniciadores específicos dos genes da via metabólica de ácidos graxos de <i>Theobroma cacao</i> .....	65
5.7 Análise da expressão gênica nos embriões de <i>Theobroma cacao</i> nos diversos estágios de desenvolvimento.....	66
<b>5.7.1 Expressão gênica das proteínas carregadoras de acil em embriões de <i>Theobroma</i> <i>cacao</i>.....</b>	<b>68</b>
<b>5.7.2 Expressão da <math>\beta</math>-cetoacil-ACP sintase II (KAS II) em embriões de <i>Theobroma cacao</i> .....</b>	<b>71</b>
<b>5.7.3 Expressão das <math>\Delta^9</math> estearoil-ACP desaturases em embriões de <i>Theobroma cacao</i> .....</b>	<b>72</b>
<b>5.7.4 Expressão das acil-ACP tioesterases A e B (Fat A e Fat B) em embriões de <i>Theobroma cacao</i> .....</b>	<b>74</b>

<b>5.7.5 Expressão acil-CoA sintetase (ACS) em embriões de <i>Theobroma cacao</i></b> .....	<b>76</b>
<b>5.7.6 Expressão Oleosina (OLEO) em embriões de <i>Theobroma cacao</i></b> .....	<b>78</b>
<b>5.8 Análise da expressão gênica nos tecidos de <i>Theobroma cacao</i></b> .....	<b>80</b>
<b>5.8.1 Expressão das proteínas carregadoras de acil A, B e C (ACP A, ACP B e ACP C) nos diversos tecidos de <i>Theobroma cacao</i></b> .....	<b>81</b>
<b>5.8.2 Expressão da <math>\beta</math>-cetoacil-ACP sintase II (KAS II) nos diversos tecidos de <i>Theobroma cacao</i></b> .....	<b>82</b>
<b>5.8.3 Expressão das esteroil-ACP desaturase nos diversos tecidos de <i>Theobroma cacao</i></b>	<b>83</b>
<b>5.8.4 Expressão das acil-ACP tioesterase A e B (Fat A e Fat B) nos diversos tecidos</b> .....	<b>85</b>
<b>5.8.5 Expressão das acil-CoA sintetase A e B (ACS A e ACS B) nos diversos tecidos de <i>Theobroma cacao</i></b> .....	<b>87</b>
<b>5.8.6 Expressão da oleosina nos embriões de <i>Theobroma cacao</i></b> .....	<b>89</b>
<b>5.9 Correlação entre acúmulo de transcritos e composição de ácido graxos das sementes em desenvolvimento</b> .....	<b>90</b>
<b>5.10 Biossíntese de ácidos graxos</b> .....	<b>94</b>
<b>5.11 Acumulação de ácido esteárico em <i>Theobroma cacao</i></b> .....	<b>95</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>97</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>99</b>
<b>APÊNCICES</b> .....	<b>108</b>
<b>APÊNCICE A</b> .....	<b>109</b>
<b>APÊNCICE B</b> .....	<b>111</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Theobroma* é o de maior importância da antiga família Sterculiaceae (agora parte da Malvaceae *sensu lato*; BAYER et al., 1999), devido à relevância econômica do cacau, *Theobroma cacao* L. (PURSEGLOVE, 1968). As sementes do cacau constituem a única fonte de manteiga de cacau e de sólidos (líquor), matérias-primas fundamentais da indústria de chocolates e confeitos, farmacêutica e cosmética (PIRES et al., 1998). A composição química singular, devido à saturação dos ácidos graxos, é responsável por suas propriedades de fusão num comportamento físico único da manteiga, com aplicações específicas e especiais. A manteiga de cacau é composta basicamente por triglicerídeos (97%), sendo o restante constituído por diglicerídeos, monoglicerídeos, e ácidos graxos livres. É caracterizada pelo alto nível de estearato (18:0 = 30-37%), em combinação com 24-31% de palmitato (16:0) e 33-39% de oleato (18:1), possuindo composição triglicéridica única. Esses ácidos graxos compõem os três principais triglicerídeos: oleodipalmitina (POP), oleodiestearina (SOS), e oleopalmitoestearina (POS), que somados representam mais de 75% da composição em triglicerídeos da manteiga de cacau.

Além do cacau, apenas poucas outras plantas acumulam quantidades importantes de estearato em suas sementes. O perfil de ácidos graxos dos embriões de *T. cacao* revelam o potencial de uso desta espécie na indústria.

Os genes que codificam as enzimas da via metabólica de biossíntese de ácidos graxos e triglicerídeos em plantas são conhecidos. As enzimas de síntese estão principalmente localizadas no estroma de plastídios e no retículo endoplasmático, e o perfil de ácidos graxos pode ser determinado por atividade diferencial desses genes, sob grande influência ambiental, principalmente da temperatura. Entretanto, os mecanismos moleculares e bioquímicos pelos quais as plantas controlam a produção de estearato, e que diferenciam as plantas acumuladoras de estearato de todas as demais não estão claramente definidos. A seletividade da enzima acil-ACP tioesterase em sementes oleaginosas acumuladoras de estearato sugeriram a existência de acil-ACP tioesterases com uma maior atividade sobre estearoil-ACP quando comparada a acil-ACP tioesterase de plantas não acumuladoras de estearato. Além disso, a menor atividade da estearoil-ACP desaturase pode também resultar na produção de maiores níveis de estearato.

Silva (2005) realizou um estudo onde identificou e caracterizou sequências gênicas expressas (EST) e a expressão de genes durante o desenvolvimento de sementes de *T. cacao*,



com ênfase na via metabólica de ácidos graxos e triglicerídeos. Foi construída uma biblioteca de cDNA de sementes de cacau em desenvolvimento, seqüenciando-se 1.305 clones, que resultaram em 892 seqüências únicas e 164 *contigs*, totalizando 1056 seqüências únicas. Entre esses, foram identificados 71 clones contendo seqüências de genes envolvidos na via metabólica de ácidos graxos e triglicerídeos. A expressão dos genes codificadores da proteína carregadora de acil (ACP),  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II (KAS II), acil-ACP tioesterase A (Fat A), acil-ACP tioesterase B (Fat B), acil-CoA sintetase (ACS) e oleosina, foram analisados por *northern blot* em sementes em desenvolvimento de *Theobroma cacao*. As conclusões corroboraram a hipótese que a ação conjunta de  $\beta$ -cetoacil sintases (KAS), esteroil-ACP desaturase, acil-ACP tioesterase A, e acil-ACP tioesterase B determinaria perfil de ácidos graxos disponíveis para a montagem dos triglicerídeos. Entretanto, a baixa qualidade do mRNA obtido de sementes de cacau limitaram a precisão dos resultados obtidos por Silva (2005). A análise quantitativa e temporal da expressão de genes codificadores de enzimas envolvidos na produção da manteiga de cacau durante o desenvolvimento das sementes de cacau, possui importância por se tratar de características bioquímicas de interesse comercial, por suas múltiplas potencialidades na obtenção de novos produtos geneticamente modificados e auxiliaria na elucidação dos mecanismos de controle da biossíntese de ácidos graxos e triglicerídeos em *Theobroma cacao*.

O presente trabalho tem como objetivo principal realizar o estudo da expressão temporal de genes relacionados à via metabólica de ácidos graxos e triglicerídeos durante o desenvolvimento de sementes de *T. cacao*, dando continuidade ao trabalho realizado por Silva (2005). O emprego da técnica de reação de amplificação em cadeia quantitativa de transcritos reversos de RNA (RT-qPCR) em embriões em desenvolvimento permitiu a concretização de um objetivo secundário: estabelecer genes referências adequados para o estudo de expressão gênica em embriões e diversos tecidos de *Theobroma cacao*. A quantificação da expressão necessita de uma série de padronizações, ou seja normalização de vários parâmetros como quantidade inicial da amostra, integridade e quantidade de RNA, eficiência enzimática da síntese de cDNA e da amplificação da PCR, atividade transcricional de tecidos e células analisadas e principalmente o uso de genes referência (*housekeepings*) adequados (BUSTIN, 2002; GINZINGER, 2002). A escolha do gene referência mais estável para o estudo em embriões e diversos tecidos de *Theobroma cacao*, é de grande importância para as futuras pesquisas nesta cultura.

Portanto, a hipótese deste trabalho é que a ação conjunta de sintases, esteroil-ACP desaturase, acil-ACP tioesterases A, e acil-ACP tioesterases B determina a acumulação de

ácido esteárico, sendo conseqüentemente relacionada ao perfil único e insubstituível da manteiga de cacau.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância econômica do gênero *Theobroma*

O gênero *Theobroma* é o de maior importância da antiga família Sterculiaceae, (agora parte da Malvaceae *sensu lato* BAYER et al., 1999), devido à relevância econômica do cacauero, *Theobroma. cacao* L. (PURSEGLOVE, 1968). O gênero possui 22 espécies (CUATRECASAS, 1964), sendo que *T. grandiflorum* (cupuaçu), *T. obovatum*, *T. subincanum*, *T. speciosum*, *T. sylvestre*, *T. microcarpum*, *T. bicolor*, *T. cacao*, *T. glaucum* e *T. canumanense*, são representadas no Brasil (CUATRECASAS, 1964; SILVA; FIGUEIRA, 2005). As espécies *T. grandiflorum* e *T. cacao* são as únicas cultivadas comercialmente (SILVA; FIGUEIRA; SOUZA, 2001; SOUZA; DIAS, 2001).

As sementes do cacauero constituem a única fonte de manteiga de cacau e de sólidos (líquor), matérias primas fundamentais da indústria de chocolates e confeitos, farmacêutica e cosmética (PIRES et al., 1998). Apresentando alto valor comercial, a manteiga de cacau é considerada uma importante matéria-prima nas indústrias alimentícia e cosmética, alcançando altos valores no mercado. Sua amêndoa é insubstituível na fabricação de produtos como chocolates, confeitos, na indústria farmacêutica e cosmética (SILVA; FIGUEIRA, 2005). Seu ponto de fusão fica um pouco abaixo da temperatura corpórea, o que a torna ideal nos produtos que necessitam desta característica (POSORSKE, 1988).

A produção anual de cacau no mundo chega a 3 milhões de toneladas e o número de pessoas que dependem dessa cultura chega a 50 milhões. Nos últimos 100 anos, o aumento anual da demanda por cacau foi de 3% ao ano (WORLD COCOA FOUNDATION, 2009). Considerando-se a produção brasileira até o mês de agosto de 2008, estimou-se 211.435 toneladas métricas e em 2006 a produção mundial chegou a 4.058.584 toneladas métricas, sendo os principais produtores Costa do marfim, Gana, Indonésia, Nigéria e Brasil (AGRIANUAL, 2009; 2008).

## 2.2 Ácidos graxos e triglicerídeos em sementes de cacauero

As sementes do cacauero apresentam em média de 53 % de gordura em peso seco não fermentado (PIRES et al., 1998). De forma similar a outros lipídeos de reserva, a manteiga de cacau é composta por cerca de 97% de triglicerídeos, mas seu perfil de ácidos graxos difere de outros óleos comerciais, consistindo principalmente de palmitato (16:0; P), estearato (18:0; S) e oleato (18:1 $\Delta^9$ ; O) em proporções similares, e linolenato (18:2 $\Delta^9,12$ ; L) em menor percentual. Os três principais triglicerídeos que compõem a manteiga de cacau são 1,3-dipalmitoil-2-oleoil-glicerol (POP), 1(3)-palmitoil-3(1)estearoil-2-oleoil-glicerol (POS); 1,3-distearoil-2-oleoil-glicerol (SOS); com ácido oleico na posição 2-sn da ligação glicerol (LIU; CHANG; LIU, 2007). Os triglicerídeos POS, SOS e POP representam mais de 75% da composição da manteiga (GUNSTONE; HARWOOD; PADLEY, 1994; GILABERT-ESCRIVA, 2002).

As propriedades físicas da manteiga de cacau derivam de sua composição de ácidos graxos e triglicerídeos (PIRES et al., 1998). Essa característica singular, devido a saturação dos ácidos graxos, é responsável pelas suas propriedades únicas de fusão num comportamento única da manteiga, com aplicações específicas e especiais. O perfil de dureza da manteiga de cacau é determinado pelo comprimento da cadeia de ácidos graxos, grau de insaturação e posicionamento no triglicerídeo (DIMICK, 1991). O alto conteúdo de estearato está diretamente relacionado a estas características (HARWOOD, 1996).

Estearato (18:0) representa apenas 1-5% da composição triglicerídica da maioria das sementes oleaginosas (GUNSTONE; HARWOOD; PADLEY, 1994). Poucas espécies de plantas acumulam quantidades significantes de estearato em suas sementes como cacauero (*Theobroma cacao*), Carité (*Butyrospermum parkii*), ‘Sal’ (*Shorea robusta*), ‘Kokum’ (*Garcinia indica*), e Mangostão (*Garcinia mangostana*) (HAWKINS; KRIDL, 1998).

### **2.3 Alterações na composição de ácidos graxos e triglicerídeos durante o desenvolvimento de sementes de cacauero**

A composição de ácidos graxos da manteiga de cacau é influenciada por fatores ambientais, entre os quais se destaca a temperatura. Desta forma, temperaturas elevadas durante a fase de desenvolvimento dos frutos conduzem a formação de ácidos graxos com menor grau de insaturação. Este aumento da saturação dos ácidos graxos determina o incremento da dureza da manteiga de cacau (BERBERT; ALVIM, 1972; BERBERT, 1976; LEHRMAN; KEENEY, 1980). *Theobroma cacao* é cultivado principalmente entre as latitudes 5°N e 5°S, entretanto o cacau produzido no sul da Bahia se desenvolve na latitude 15°S, onde enfrenta temperaturas mais baixas durante o inverno. A temperatura baixa aumenta o conteúdo de ácidos oleico e linoleico na manteiga de cacau, ocasionando um amolecimento na manteiga de cacau de frutos colhidos no sul da Bahia entre os meses de agosto a outubro, o que diminui o seu preço no mercado internacional (FIGUEIRA et al., 2000).

O tempo necessário para a maturação dos frutos de *Theobroma cacao* varia de cinco a seis meses (SOUZA; DIAS, 2001). Estudos comprovaram que existem diferenças na insaturação da manteiga de cacau quando relacionam-se frutos verdes e maduros, concluindo-se que a insaturação diminui durante a maturação dos frutos (DITTMAR; DUARTE, 1960). Alterações na composição lipídica da manteiga de cacau de sementes colhidas em intervalos de 110 dias após a polinização (DAP), até a maturação dos frutos permitiu concluir-se que em todos os estágios do desenvolvimento os triglicerídeos estão presentes, o que corresponde a 69-96% dos lipídeos totais (LEHRMAN; KEENEY, 1980). Entre 120 e 150 DAP, a síntese de triglicerídeos ocorre a uma taxa praticamente linear, estabilizando-se no período final do desenvolvimento. O teor de lipídeos encontrados na matéria seca triplica entre 110 e 130 DAP, passando de 16,2% para 50,1%. A composição de ácidos graxos altera-se entre 110 e 140 DAP juntamente com o aumento no teor de ácido esteárico e diminuição de ácido linoleico, estabilizando-se aos 150 DAP (LEHRMAN; KEENEY, 1980).

## 2.4 Biossíntese de ácidos graxos em plantas

A síntese de ácidos graxos nas plantas ocorre no interior dos plastídios. Dois complexos de enzimas são responsáveis pela síntese de ácidos graxos: acetil- CoA carboxilase (ACCCase) e Sintase de Ácidos Graxos (FAS) (Figura 2.1). O sistema ACCCase é responsável pela carboxilação do acetil- CoA, substrato inicial da síntese de ácidos graxos, formando malonil- CoA. As enzimas do complexo FAS catalisam o crescimento da cadeia carbônica adicionando carbonos provenientes da acetil- CoA até atingir 18 carbonos. O alongamento da cadeia de ácidos graxos é dependente de um co-fator, denominado proteína carregadora de acil (ACP) (SOMERVILLE, 1991; SOMERVILLE et al., 2000).

A alongação das ligações carbono-carbono é realizada pelas enzimas 3-Ketoacil-ACP sintase (KAS), as quais são representadas por três isoenzimas (I, II e III). KAS III tem forte preferência por Acetil-CoA, na qual adicionando carbonos irá se formar malonil-CoA. KAS I tem preferência a substratos Acil-ACP alongando a cadeia até palmitoil-ACP (16:0-ACP), e KAS II alonga palmitoil-ACP (16:0-ACP) até estearoil-ACP (18:0-ACP).

Ácidos graxos monoinsaturados são formados por duplas ligações que são introduzidas nas cadeias carbônicas por enzimas desaturases. Existem isoformas destas enzimas, as quais agem em diferentes substratos. Palmitoil-ACP e estearoil-ACP podem sofrer insaturações pelas enzimas  $\Delta^6$ estearoil-ACP desaturase ( $\Delta^6$ SAD) e  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase ( $\Delta^9$ SAD), respectivamente (SOMERVILLE, 1991; SOMERVILLE et al., 2000).

Nas plantas, normalmente a cadeia carbônica é alongada em 16:0 ou 18:0 carbonos e ao atingirem esses comprimentos, algumas enzimas agem hidrolisando as cadeias carbônicas, transformando-as em ácidos graxos livres. A reação mais comum é a realizada por enzimas tioesterases, as quais quebram as ligações ésteres da parte acil da ACP. Existem dois tipos principais de Acil-ACP tioesterases; Fat A e Fat B. Fat A é a mais abundante e tem preferência pelo substrato 18:1-ACP, e Fat B agem em 16:0-ACP. Essa clivagem permite que a cadeia pare de ser alongada, e a parte acil seja exportada para fora do plastídio (SOMERVILLE, 1991; SOMERVILLE et al., 2000).

Os ácidos graxos livres são re-esterificados a CoA pela enzima acil-CoA sintetase (ACS), para assim serem transportados até o retículo endoplasmático, onde irão participar da biossíntese dos lipídeos de membrana e de reserva (MILLAR; SMITH; KUNST, 2000).

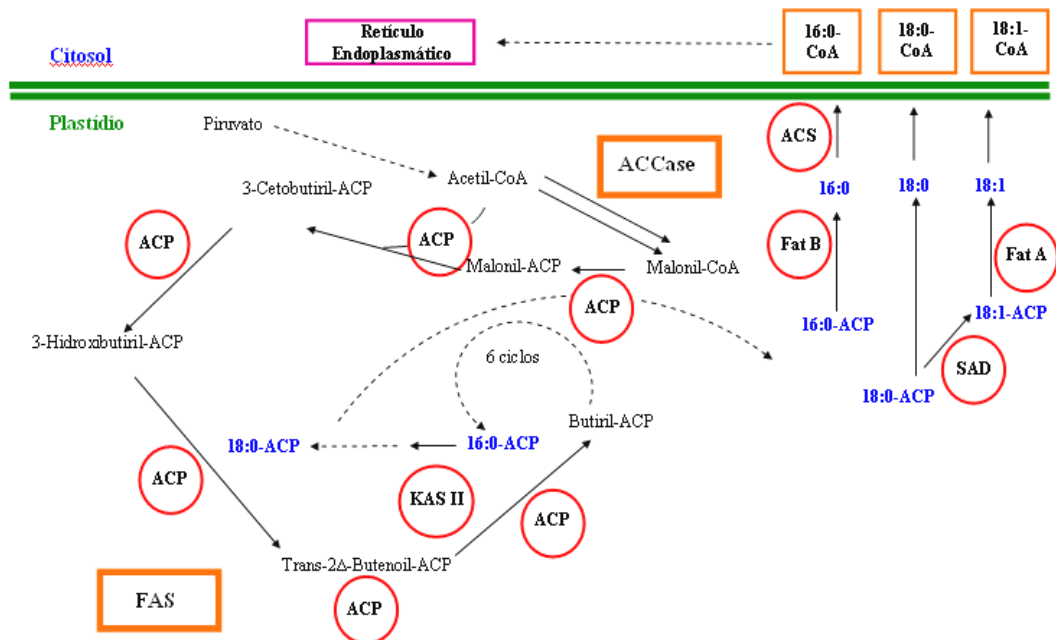


Figura 2.1 - Biossíntese de ácidos graxos em plantas. As principais enzimas da via apresentam-se circuladas

## 2.5 Biossíntese e empacotamento de triglicerídeos em plantas

Triglicerídeos, também chamados de triacilgliceróis (TAGs), são os maiores componentes das sementes oleaginosas (YEN et al., 2008). Essas moléculas constituem-se de um glicerol esterificado a três ácidos graxos (GARRETT; GRISHAM, 1999). A via de síntese de triglicerídeo nas plantas é conhecida como via de Kennedy ou glicerol fosfato (KENNEDY, 1957), a qual é presente em quase todas as células (YEN et al., 2008). A síntese dos glicerolípídeos é o primeiro passo para a formação dos triglicerídeos, iniciando-se com a acilação do glicerol 3-fosfato, pela ação da enzima glicerol 3-fosfato aciltransferase (GPAT) (GIMENO; CAO, 2008 e GONZALEZ-BARÓ; LEWIN; COLEMAN, 2007). A família de enzimas 1-acilglicerol 3-fosfato aciltransferase (AGPAT), a qual produz o fosfatidato, convertem ácidos graxo em ácido lisofosfatídico (LPA) (AGARWAL; GARG, 2003). O fosfatidato é o precursor do diacilglicerol (DAG) e a transferência do grupo acil da acil-CoA

para a posição *sn*-3 do diacilglicerol (DAG) pela enzima diacilglicerol aciltransferase (DAGAT), finaliza a biossíntese de triglicerídeos (MILLAR; SMITH; KUNST, 2000) (Figura 2.2).

Os lipídeos estocados como TAGs são compartimentalizados em estruturas esféricas, denominadas de corpos gordurosos. Estes corpos gordurosos medem cerca de 0,5-2,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro e são envoltos por uma monocamada lipídica coberta por uma membrana protéica (HUANG, 1996; JOLIVET et al., 2004; LIN et al., 2002; NAESTED et al., 2000; TZEN et al., 1997; TZEN et al., 1993). Cerca de 1-4% do peso dos corpos oleosos das sementes são compostos por proteínas (HUANG, 1992; TZEN; HUANG, 1992) e as oleosinas são as maiores representantes destas (TZEN et al., 1990).

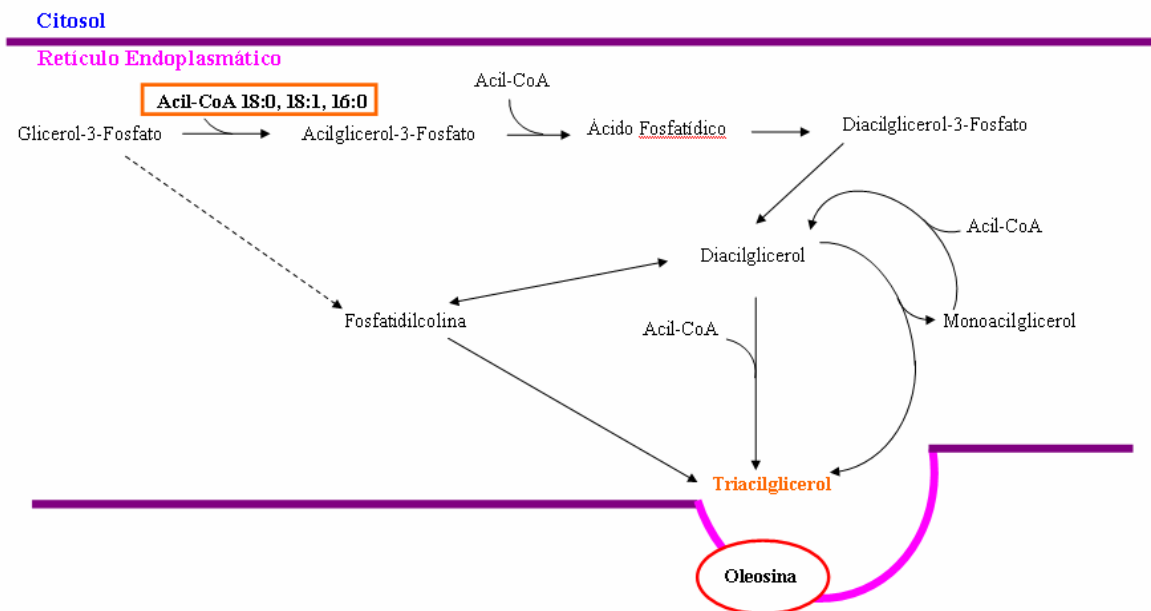


Figura 2.2 - Biossíntese e empacotamento de triglicerídeos. A proteína oleosina está circunscrita



## 2.6 Desenvolvimento e produção de triglicerídeos nas sementes de cacau

No início do desenvolvimento, as sementes do cacauzeiro apresentam-se delicadas, cheia de endosperma líquido e envolvida por uma fina testa. Nos dois primeiros meses, os óvulos de cor esbranquiçada continuam a se desenvolver, aumentando de tamanho e enchendo-se de material gelatinoso, o endosperma (LEHRIAN; KEENEY, 1980). Até 85 DAP, os frutos aumentam significativamente seu volume, e aos 90 dias, o embrião torna-se visível a olho nu. Do início do desenvolvimento até os 120 DAP, ocorre uma discreta acumulação de lipídeos de membrana, ricos em ácidos graxos insaturados. A partir dos 120 DAP, o embrião de cacauzeiro inicia o acúmulo de ácidos graxos e triglicerídeos, os quais são sintetizados rapidamente. Esse estágio de síntese de triglicerídeos acontece até os 150 DAP. Nesse espaço de tempo, os embriões trocam sua cor brça-rosada pela cor púrpura. A partir dos 150 DAP os embriões atingem a maturidade e encerram a síntese de triglicerídeos (LEHRIAN; KEENEY, 1980 e APPELQVIST, 1975). As sementes nos seus respectivos estágios de amadurecimento são mostradas na Figura 5.1.

## 2.7 Plantas acumuladoras de estearato

O perfil de ácidos graxos das sementes das várias espécies revelam o seu potencial de uso na indústria e no estudo da síntese de lipídios de reserva, além de mecanismos que regulam a composição de ácidos graxos (CARPENTER et al., 1994). Silva (2000) baseando-se na composição de ácidos graxos constatou que as espécies de *Theobroma* e *Herrania* podem ser descritas de acordo com a expressão diferenciada de tioesterases, desaturases e elongases, com potencial de uso em estudos de filogenia e também com uso potencial na indústria e/ou estudo da síntese de lipídios de reserva, bem como mecanismos que regulam a composição de ácidos graxos. Gilabert-Escriva (2002), analisaram o perfil lipídico de oito espécies brasileiras de *Theobroma* e o gênero *Herrania*, com o objetivo de avaliar outras fontes para a obtenção de manteiga de cacau ou um substituto similar. Foi concluído que apesar de algumas espécies serem potenciais substitutos, nenhuma possui o ponto de fusão semelhante ao de *Theobroma cacao*.

Os mecanismos moleculares e bioquímicos pelos quais as plantas controlam a produção de estearato, e que diferenciam as plantas acumuladoras de estearato de todas as demais não estão claramente definidos. A seletividade da acil-ACP tioesterase em sementes oleaginosas acumuladoras de estearato sugere a existência de acil-ACP tioesterases com uma maior atividade sobre estearoil-ACP quando comparada a acil-ACP tioesterase de plantas não acumuladoras de estearato. A atividade de acil-ACP tioesterase medida em extrato bruto de sementes de mangostão (*Garcinia mangostana*) mostrou preferência pelo substrato oleoil-ACP (18:1-ACP), porém apresentou significativa atividade pelo substrato estearoil-ACP (18:0-ACP) (15% de atividade relativa ao oleoil-ACP), quando comparado com palmitoil-ACP (16:0-ACP) (6%) ou 14:0-ACP (2%) (HAWKINS; KRIDL, 1998; VOELKER; KINNEY, 2001). A atividade de acil-ACP tioesterases plastidial isoladas de sementes de cacau mostrou preferência pelo substrato oleoil-ACP e menor afinidade, porém significativa, pelos substratos estearoil-ACP (34 a 40% de atividade relativa ao oleoil-ACP) e palmitoil-ACP (7 a 12%) (GRIFFITHS; WALSH; HARWOOD, 1993). Estes resultados diferem da atividade de tioesterases medidas em extratos brutos de sementes de cártamo (*Carthamus tinctorius*) e *Brassica*, onde 18:1-ACP é o substrato preferido, porém os substratos 16:0-ACP e 18:0-ACP são usados em taxas iguais (KNUTZON et al., 1992). A atividade desigual de tioesterases sobre os substratos saturados 16:0-ACP e 18:0-ACP em mangostão e cacau sugere que sementes que acumulam grandes quantidades de estearato podem conter tioesterases com atividades distintas daquelas encontradas em plantas não acumuladoras de estearato, mas não tioesterases específicas (HAWKINS; KRIDL, 1998; VOELKER; KINNEY, 2001).

Diversas acil-ACP tioesterases têm sido isoladas de várias plantas e uma comparação de mais de 30 tioesterases vegetais, baseada em diferenças em suas seqüências primárias de aminoácidos deduzidas e deleções características de aminoácidos nas proximidades de seu provável sítio ativo, permitem classificá-las em dois tipos: (1) acil-ACP tioesterases Fat A, tioesterases relativamente específicas para oleoil-ACP (18:1-ACP), porém apresentam uma menor atividade sobre estearoil-ACP (18:0-ACP) e palmitoil-ACP (16:0-ACP), e (2) acil-ACP tioesterases Fat B, tioesterases preferencialmente acil-ACP saturado (JONES et al., 1995; OHLROGGE; JAWORSKI, 1997).

Embora a existência de acil-ACP tioesterases Fat A com elevada atividade, porém não específica, sobre o substrato estearoil-ACP possa esclarecer a maneira pela qual algumas plantas acumulam quantidades significativas de estearato em suas sementes, ela não é suficiente para explicar o acúmulo de estearato em sementes de *T. cacao*. Griffiths, Walsh e

Harwood (1993) avaliando a atividade de acil-ACP tioesterases em dois estágios do desenvolvimento de sementes de cacau correspondentes à baixa (105 dias após a antese) e alta produção de estearato (130 dias após a antese), concluíram que não existe a indução de expressão de uma nova acil-ACP tioesterases com maior seletividade para estearoil-ACP no acúmulo de estearato na manteiga de cacau, pois não há mudança na seletividade enzimática com a idade do tecido. Na maioria das plantas, a maior parte do 18:0-ACP produzido sofre uma insaturação no carbono 9 catalisada pela  $\Delta^9$ -estearoil-ACP desaturase, para formar oleoil-ACP (VOELKER; KINNEY, 2001). A supressão da atividade de  $\Delta^9$ -estearoil-ACP desaturase pode resultar na produção de maiores níveis de estearato (18:0), porém uma atividade normal ou aumentada dessa enzima deve favorecer a produção de oleato (18:1).

Os níveis de estearoil-ACP desaturase de embriões em desenvolvimento de cacau entre 95 e 145 dias após a polinização (DAP) foram determinados por *Western Blot* utilizando anticorpo de coelho para estearoil- ACP desaturase de abacate (PATEL, 1993). Estearoil-ACP desaturase de cacau foi detectada em extratos de proteína total solúvel entre 95 e 105 DAP, e apresentou uma concentração 2,3 vezes maior aos 95 DAP quando comparado à abundância da proteína aos 105 DAP. Não foi detectada a presença de estearoil-ACP desaturase nos extratos obtidos a partir dos 115 DAP. Entretanto a presença desta enzima nos extratos brutos após os 115 DAP pode ser inferida a partir da síntese de ácido oleico (18:1) ao longo de todo período de desenvolvimento do embrião (PATEL, 1993). Durante o período de maior abundância de estearoil-ACP desaturase, entre 95 e 115 DAP, há um significativo aumento nos teores de ácido esteárico (18:0) e oleico (18:1), e decréscimo na quantidade de ácido linoleico (18:2) e palmítico (16:0), portanto a avaliação isolada da atividade estearoil-ACP desaturase não explica o acúmulo de estearato nas sementes de cacau.

## 2.8 Recursos genômicos para o cacauero

Bibliotecas de genes expressos são importantes para o fornecimento de informações sobre determinado organismo, facilitando o entendimento de funções de genes, permitindo a execução dos mais diversos experimentos.

Com o objetivo de descobrir e entender possíveis mecanismos naturais de defesa em *Theobroma cacao*, Jones et al. (2002) sequenciaram e reuniram cDNAs provenientes de folhas e sementes, produzindo um único *contig* com 1380 membros. Verica et al. (2004) baseando-se na hipótese de que a ativação da defesa das plantas é associada a mudanças na expressão de um grande número de genes, construíram uma biblioteca subtrativa de cDNA, através dos estudos em microarranjo, sequenciamento e ferramentas de bioinformática, para identificar os genes induzidos por moléculas sinalizadoras.

Silva (2005) construiu uma biblioteca de cDNA de sementes em desenvolvimento de *Theobroma cacao*. Com o sequenciamento de 1305 clones, 892 sequências únicas, 164 *contigs*, totalizando 1056 unigenes, apresentou um índice de novidade de 80,92%. Neste estudo, foram identificados 71 clones contendo sequências de genes envolvidos na via metabólica de ácidos graxos e triglicerídeos, representados por 39 *singletons* e 29 *contigs*. Essas sequências foram depositadas no banco de genes da UNICAMP, disponível em (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cacau>).

Outra biblioteca bastante completa e útil nos estudos de biossíntese de ácidos graxos em *T. cacao*, foi a coleção de EST descrita por Argout et al. (2008). Em uma colaboração internacional, reuniram cinquenta e seis bibliotecas de cDNA de *Theobroma cacao*, provenientes de diferentes órgãos, genótipos e condições ambientais. Possuindo um total de 149650 ESTs, correspondentes a 48594 unigenes, 12692 *contigs* e 35902 *singletons*, esta biblioteca mostrou-se adequada para estudos de vias metabólicas bioquímicas. Esta coleção de ESTs é considerada única, sendo de fundamental importância para estudos em *Theobroma cacao*.

## 2.9 Amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) e genes referência

Métodos eficientes de estudos de expressão gênica têm permitido a análise de grande número de genes envolvidos nos diversos processos biológicos, desde o desenvolvimento dos organismos até suas interações com fatores ambientais (DONSON et al., 2002). Recentemente o método mais utilizado para a avaliação da expressão gênica é amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) devido à rapidez, especificidade e sensibilidade que essa técnica detecta e quantifica ácidos nucleicos (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004). RT-qPCR permite coletar dados da PCR com amplificação e detecção em tempo real, através da captação da fluorescência proporcionalmente a quantidade de produtos amplificados (HIGUCHI et al., 1993).

A quantificação por RT-qPCR necessita de uma série de padronizações, ou seja, normalização de vários parâmetros como quantidade inicial da amostra, integridade e quantidade de RNA, eficiência enzimática da síntese de cDNA e da amplificação da PCR, atividade transcricional de tecidos e células analisadas e principalmente o uso de genes referência (*housekeepings*) adequados (BUSTIN, 2002; GINZINGER, 2002).

Dois métodos de quantificação da expressão gênica são geralmente usados: absoluta e relativa. Na quantificação absoluta, o número absoluto de cópias de RNA mensageiro é determinado por comparação a uma curva padrão determinada (PFAFFL; HAGELEIT, 2001). A expressão relativa é baseada na taxa de expressão de um gene alvo comparada com um gene referência. Esse tipo de quantificação pode ser muito eficaz, mas os resultados são fortemente dependentes do gene referência e dos métodos de normalização usados (PFAFFL, 2001). Segundo Vandersompele et al. (2001), para medir a expressão gênica com acurácia, devem-se usar múltiplos genes referência, sendo que o mínimo ideal são os três genes referência mais estáveis. Alguns modelos matemáticos foram desenvolvidos para o cálculo da expressão relativa, os quais podem ou não usar a correção da eficiência (PFAFFL, 2001; SOONG et al., 2000 e KENNETH, THOMAS, 2001).

Os genes referência comumente utilizados são principalmente os codificadores de proteínas responsáveis pela manutenção das estruturas e metabolismo básicos da célula, como por exemplo, tubulinas (CHOI et al., 1991; SERELS et al., 1998), actinas (CHOI et al., 1991; WEI et al., 1997) e 18S, 28S rRNA (FINNEGAN et al., 1993; BHATIA et al., 1994). Genes com essas funções não devem variar sua expressão nos tecidos, células, mudanças no meio ambiente e sob os diferentes tratamentos em um experimento. Porém, a estabilidade desses

genes pode variar consideravelmente e diversos estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de escolher o gene mais adequado para cada experimento (VANDESOMPELE et al., 2002; THELLIN et al., 1999; LØVDAL; LILLO, 2009; PAOLACCI et al., 2008; HONG et al., 2008; CZECHOWSKI et al., 2005; REMANS et al., 2008; SCHMITTGEN; ZAKRAJSEK, 2000 e CRUZ et al., 2008).

Alguns métodos estatísticos foram propostos com o objetivo de avaliar candidatos a gene referência e *softwares* como *GeNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002) e *NormFinder* (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004) têm sido usados para esse fim (HONG et al., 2008; PAOLACCI et al., 2008; VANDESOMPELE et al., 2002).

*GeNorm* é uma ferramenta aplicada pelo Microsoft Excel que está disponível na internet. Este programa determina o gene *housekeeping* mais estável de um conjunto de genes testados e calcula um fator de normalização que pode ser incorporado na expressão do gene em cada amostra de tecido. Para todos os genes, é calculada a variação aos pares, analisando a variação da expressão dois a dois de todas as possíveis combinações gênicas. A estabilidade do gene é dada por um valor M, o qual é inversamente proporcional a variação de expressão do gene avaliado (VANDESOMPELE et al., 2002). *NormFinder* calcula a variação da expressão intra e intergrupos, onde os grupos são definidos como as diferentes condições do experimento. O programa também calcula os valores de estabilidade para os genes candidatos organizando em escala decrescente os mais estáveis (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004).

### 3. OBJETIVOS

- Analisar a composição dos ácidos graxos e triglicerídeos em sementes de cacauero em desenvolvimento.
- Investigar a expressão temporal de genes envolvidos na via metabólica de ácidos graxos e triglicerídeos durante o desenvolvimento de sementes de *T. cacao*, sendo enfatizados os genes já identificados da acil (ACP),  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II (KAS II), acil-ACP tioesterase tipo A (Fat A), acil-ACP tioesterase tipo B (Fat B), acil-CoA sintetase (ACS), e oleosinas, além da  $\Delta^9$ -estearoil-ACP desaturase.
- Investigar e comparar o padrão temporal de expressão dos genes envolvidos na via metabólica de ácidos graxos e triglicerídeos durante o desenvolvimento de sementes de *Theobroma cacao*.
- Identificar dos genes referência mais estáveis para estudos em sementes e diversos tecidos de *Theobroma cacao*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, SP. Foram estudadas as expressões dos genes da via metabólica de ácidos graxos em sementes de *T. cacao* e em outros tecidos (folhas em expansão, folhas expandidas, flor, caule, raiz, ápice vegetativo e epicarpo).

### 4.1 Material vegetal

#### 4.1.1 Sementes de *T. cacao*

Foram realizadas polinizações manuais na estação Experimental de Recursos Genéticos “José Haroldo” (Marituba, PA) do genótipo PA016. Dois a três frutos de *T. cacao* foram coletados aos 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160 dias após a polinização (DAP). Após a coleta dos frutos, as sementes foram armazenadas em *ultrafreezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$ , e foram transportadas em gelo seco até o Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) onde foram processadas para extração de RNA total e caracterização do perfil de ácidos graxos.

#### 4.1.2 Tecidos de *T. cacao*

Foram utilizadas plantas de cacau (*T. cacao*) cultivadas em casa de vegetação, em substrato de terra vegetal por cerca de cinco meses. Foram coletadas amostras de folhas em expansão, folhas expandidas, caule, raiz e ápice vegetativo. Amostras de flores e frutos (para a retirada da casca) foram coletadas na plantação de cacau da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP. As amostras dos tecidos vegetais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em *ultrafreezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de RNA total.



## 4.2 Identificação de genes associados à via metabólica de biossíntese de ácidos graxos

### 4.2.1 Busca das sequências

Com base no estudo de Silva (2005), foram realizadas buscas das seqüências dos principais genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos. Foram buscadas as seqüências de três isoformas da proteína carregadora de acil (ACP A, ACP B e ACP C),  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II (KAS II), duas isoformas da  $\Delta^9$  estearoil-ACP desaturase (SAD A e SAD B), acil-ACP tioesterase A (Fat A), acil-ACP tioesterase B (Fat B), duas isoformas da isoformas da acil-CoA sintetase (ACS A e ACS B), e oleosina.

A partir do nome do gene-alvo, as seqüências foram obtidas nos bancos de dados do *GeneIndex* de *T. cacao* do TIGR (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=cocoa>), banco de genes da UNICAMP (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cacau>), banco de genes de *Arabidopsis* ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) e na coleção de ESTs de cacau descrita por Argout et al. (2008) (Tabela 5.1). Utilizando-se a ferramenta *BlastX* da base de dados NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), as seqüências foram confirmadas para os genes de interesse.

### 4.2.2 Construção dos iniciadores

Com o uso do programa Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>) e ClustalW (<http://align.genome.jp/>), as seqüências referentes a cada gene foram alinhadas e a região mais conservada foi selecionada para o desenho dos iniciadores. Os *primers* foram construídos empregando o programa *on-line Primer3* ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)), ajustado com os parâmetros padrões, exceto: o tamanho do fragmento a ser amplificado, variando de 100 a 300 pb; tamanho do *primer* entre 19 e 21 pb (ótimo a 20 pb); temperatura de anelamento entre 59 e 61°C (ótimo a 60°C); conteúdo GC% entre 40 e 60% (ótimo a 50%); fator de auto-complementariedade máxima na região 3' de zero. Dentre os pares de iniciadores obtidos para cada gene de interesse, selecionou-se aquele com melhores características segundo o programa *on-line NetPrimer*

(<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>), em relação à estabilidade e eventual ocorrência de pareamento indesejável; como a formação de alças (*hairpins*), dímeros do mesmo iniciador (*primer dimers*) e entre o par de iniciadores (*cross dimers*).

### **4.3 Extração de RNA**

Todo procedimento de extração de RNA foi realizado na bancada livre de ribonucleases, usando-se luvas de látex descartáveis, com utensílios exclusivos de manipulação de RNA. Pistilos, cadinhos e espátulas foram lavados com solução 0,01% SDS (p/v), e enxaguados com água, água destilada e água ultrapura (milli-Q). O material foi incubado com água tratada com 0,01% dietilpirocarbonato (DEPC) ativo por duas horas na capela e secos, antes de serem embalados com papel alumínio, autoclavados a 120°C por 20 min e secos na estufa (80°C). Todas as soluções utilizadas na extração de RNA foram preparadas com água 0,01% DEPC inativa (autoclavada) e autoclavadas novamente.

#### **4.3.1 Extração de RNA de sementes de *T. cacao***

##### **Extração de RNA**

O RNA total de sementes de *T. cacao* foram extraídos de acordo com o protocolo proposto por Verica et al. (2004) com algumas modificações, conforme descrito acima.

##### **Lavagem e purificação do RNA**

Usando-se o kit RNeasy (Quiagen; Hilden; Alemanha), foi adicionado 500 µL de tampão RLT com 250 µL de etanol (95-100%) gelado e agitou-se imediatamente com a pipeta

para a lavagem do RNA. A solução foi transferida para um tubo de coluna e centrifugada a 8000 g a 4°C por 15 s descartando-se o líquido. Cerca de 700 µL de tampão RW1 foram adicionados e centrifugados a 8000 g, 4°C por 15 s. A coluna foi colocada em um novo tubo, adicionou-se 500 µL de tampão RPE e centrifugou-se a 8000 g a 4°C por 15 s. Adicionou-se 500 µL de tampão RPE e centrifugou-se a 8000 g a 4°C por 2 min. A coluna foi transferida para outro tubo de 1,5 mL e 30 µL de água ultrapura (milli-Q) DEPC autoclavada foram adicionados. Centrifugou-se a 8000 g a 4°C por 1 min e o RNA recuperado foi armazenado *ultrafreezer* a -80°C.

#### 4.3.2 Extração de RNA de diversos tecidos de *T. cacao*

##### Extração de RNA

O RNA total dos tecidos de folhas em expansão, folhas expandidas, caule, raiz, ápice vegetativo, flor e casca do fruto de *T. cacao* foi extraído baseando-se no protocolo proposto por Verica et al. (2004). Foram estabelecidas algumas modificações do processo de extração após alguns testes usando-se o Mini Kit RNeasy (Quiagen). A extração de RNA iniciou-se a partir de 100 mg de tecido de embrião de sementes de *T. cacao*, macerado em nitrogênio líquido e transferido para um tubo de centrífuga, onde adicionou-se 1 mL de tampão de extração [2 % CTAB (m/v); 2% PVP (m/v); 100 mM Tris pH 8,0; 25 mM EDTA; 2 M NaCl; 2% β-mercaptoetanol (v/v) e 0,5 g L<sup>-1</sup> Espermidina (m/v)]. Após a homogeneização, as amostras foram colocadas em banho seco a 65°C por 30 min. Adicionou-se 1 mL de clorofórmio, seguindo-se de homogeneização e centrifugação a 8000 g por 20 min a 4°C. Aproximadamente 650 µL de sobrenadante foram coletados e transferidos para um novo tubo de 1,5 mL e o RNA total foi precipitado com 540 µL de solução de Cloreto de Lítio (8 M) por 12 h a 4°C. Após a centrifugação a 8000 g por 30 min a 4°C, o RNA total decantado foi purificado seguindo as especificações do kit RNAeasy (Quiagen; Hilden; Germany).

## Lavagem e purificação do RNA

Após a centrifugação a 8000 g por 30 min a 4°C, o RNA total decantado foi ressuspenso seguindo as especificações do Mini Kit Invisorb *Spin Plant* RNA (Invitex). O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 900 µL de tampão DCT adicionado de 9 µL de DTT 1/100 (v/v). A solução foi mantida por cerca de 30 min a temperatura ambiente, mexendo sempre e centrifugando no final com velocidade máxima por 1 min. O sobrenadante foi transferido para o pré-filtro e centrifugado a 9300 g por 1 min a temperatura ambiente. O pré-filtro foi descartado e adicionou-se 500 µL de etanol absoluto misturado por pipetagem. A solução foi transferida para o tubo de coluna RTA *Spin filter*, incubada por 1 min, centrifugada a 9300 g por 1 min a temperatura ambiente e o líquido da parte de baixo foi descartado. Adicionou-se 500 µL de *Wash Buffer* R1, centrifugou-se a 9300 g a temperatura ambiente, por 30 s e descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados 700 µL de *Wash Buffer* R2 e centrifugou-se a 9300 g a temperatura ambiente, por 30 s. Novamente 700 µL de *Wash Buffer* R2 foram adicionados e centrifugou-se a 13400 g a temperatura ambiente, por 3 min. O filtro foi transferido para outro tubo de 1,5 mL e adicionou-se 30 µL de Tampão de Eluição R. Após a centrifugação de 9300 g por 2 min a temperatura ambiente, o RNA total foi armazenado em *ultrafreezer* a -80°C.

### 4.4 Quantificação e análise da integridade do RNA total

Para conferir a integridade e a concentração do RNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel 1,2% agarose com tampão SB (10 mM NaOH pH 8,5; ajustado com ácido bórico) (BRODY; KERN, 2004) a 3 V cm<sup>-1</sup>. Utilizando-se uma alíquota de 3 µL do RNA total coloridos com 7 µL de tampão da amostra [50% de formamida; 1X MOPS (20 mM MOPS, pH 7,0; 50 mM acetato de sódio; 1 mM EDTA); 17,5% formaldeído; 0,4 mg mL<sup>-1</sup> brometo de etídeo, e 10X *loading buffer* (0,25% azul bromofenol; 0,25 % xileno cianol; 0,1 mM EDTA, pH 8; 50% glicerol)] as amostras foram aquecidas a 65°C por 10 min e colocadas no gelo imediatamente para a eliminação do efeito da estrutura secundária.

Para determinação da concentração e pureza do RNA total extraído, uma alíquota de 3

$\mu\text{L}$  de RNA foi diluída em 600  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (milli-Q), a qual foi submetida à leitura óptica no espectrofotômetro Ultrospec 1100 pro (Amersham Biosciences) em 260 nm.

#### 4.5 Tratamento com DNase

Para digerir ácido desoxirribonucléico contaminante (DNA), 1  $\mu\text{g}$  do RNA total foi tratado com a enzima DNase I (Fermentas *Life Sciences*). A enzima foi utilizada na concentração de 1 Unidade/microlitro (U/ $\mu\text{L}$ ) com 1 U de RNase *out*, tampão apropriado e água ultrapura (milli-Q) DEPC autoclavada para volume final de 10  $\mu\text{L}$ . A reação foi incubada no termociclador GeneAmp PCR *System* 9700 (Applied Biosystems) a 37°C por 30 min. Para que ocorresse a inativação da enzima, adicionou-se 1  $\mu\text{L}$  de 25 mM EDTA, incubando a 65°C por 10 min, sendo colocado no gelo imediatamente.

#### 4.6 Síntese de cDNA

O RNA tratado com DNase foi preparado para a síntese acrescentando-se 1  $\mu\text{L}$  de 50 mM *primer* poli-T (oligo-dT 18 pb), incubado por 5 min à 70°C resfriado a 4°C por 5 min. Para a transcrição reversa, adicionou-se 3 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 5  $\mu\text{M}$  de dNTPs ; 2 U de RNase *out* (Invitrogen); 1 U da enzima Improm-II *Reverse Transcriptase* (Invitrogen) e tampão apropriado. A reação de transcrição reversa foi realizada no termociclador GeneAmp PCR *System* 9700 e o programa utilizado foi de 25°C por 5 min, 42°C por 60 min e 70°C por 15 min. Após sintetizados, os cDNAs foram armazenados a -20°C.

#### 4.7 Confirmação da eficiência da síntese de cDNA

Realizou-se uma reação de RT-PCR para a confirmação da eficiência da síntese do cDNA recém sintetizado, utilizando-se o iniciador do gene da Actina, com eficiência e

especificidade previamente testadas. A reação seguiu os seguintes parâmetros: 1  $\mu\text{L}$  de cDNA na diluição 1:10 (v/v), 0,2 mM de DNTPs, 5  $\mu\text{M}$  de cada iniciador da Actina (*Forward* e *Reverse*), 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1 U da enzima *Taq* polimerase, 10x *Taq buffer* com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (750 mM Tris-HCl, pH 8.8; 200mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) – (Fermentas) e água ultrapura (Mili-Q) estéril, totalizando 25  $\mu\text{L}$  de reação. Os produto amplificados foram visualizados em gel 1,5% agarose, tampão SB e eletroforese a 3 V  $\text{cm}^{-1}$ . Para certificação do tamanho do fragmento utilizou-se marcador de peso molecular GeneRule 100 pb DNA *Ladder* (Fermentas).

#### 4.8 Clonagem e seqüenciamento

A identidade dos fragmentos gerados pelos iniciadores construídos foi assegurada por clonagem e sequenciamento. Uma reação de amplificação foi conduzida (nos padrões da descrita para a confirmação da eficiência da síntese de cDNA), e a ligação dos fragmentos amplificados foi realizada em vetores de clonagem pGEM-T *Easy PCR Product Cloning Kit* (Promega) seguindo as especificações do fabricante. A ligação foi mantida a 8°C por 17 h e após esse período, 2  $\mu\text{L}$  da ligação foram transferidos para um tubo contendo 40  $\mu\text{L}$  de células eletrocompetentes de *E. coli*, linhagem DH10B. Para a eletroporação, utilizou-se um eletroporador modelo *micropulser* – (BioRad) e em cubetas de 0,2 mm aplicou-se um pulso de corrente elétrica de 1,8 KV por 3,4 s. Rapidamente as células foram transferidas para um tubo contendo 1 mL de meio líquido SOC (20 g  $\text{L}^{-1}$  bacto triptona, 5 g  $\text{L}^{-1}$  extrato de levedura e 0,5 g  $\text{L}^{-1}$  NaCl, 250 mM de KCl pH 7,0 e 2 M  $\text{MgCl}_2$ ) e mantidas a 37°C por 1 h em agitação. O material foi centrifugado por 5 min a 2000 g sedimentando as bactérias. O sobrenadante foi então descartado e cerca de 100  $\mu\text{L}$  restantes foram ressuspensos e plaqueados em meio LB sólido (Luria-Bertani, composto de 10 g  $\text{L}^{-1}$  triptona, 10 g  $\text{L}^{-1}$  NaCl e 5 g  $\text{L}^{-1}$  extrato de levedura e 15 g  $\text{L}^{-1}$  de Bactoagar) contendo 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina; adicionado de 100 mM IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo). As placas foram mantidas a 37°C por 17 h para o crescimento das colônias com o fragmento de interesse. As colônias brancas foram selecionadas e crescidas em 5 mL de meio líquido LB com 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina, sendo mantidas em agitação constante a 37°C por 17 h. Após esse período de incubação, 500  $\mu\text{L}$  do volume foram estocados em 50% glicerol a -80°C e o restante foi utilizado na minipreparação.

#### 4.9 Minipreparação do DNA plasmidial

O protocolo utilizado para o isolamento e purificação de DNA do plasmídeo, usou como base a lise alcalina, proposto originalmente por Birboim e Doly (1979). Cerca de 1,5 mL foi centrifugado por 1 min a 12000 g a 20°C. O sobrenadante foi descartado e esse procedimento foi realizado mais uma vez para aumentar o rendimento da minipreparação. Ressuspendeu-se o *pellet* em 200 µL da Solução I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, autoclavada por 20 min a 120°C), permanecendo por 10 min à temperatura ambiente. Adicionou-se 200 µL da Solução II (0,2 M NaOH, 1,0% SDS), misturou-se por inversão e incubou-se no gelo por 5 min. Foram adicionados 150 µL da Solução III (3 M KOAc, pH 5,5), misturados por inversão e incubados no gelo por 5 min. Centrifugou-se por 10 min e o sobrenadante que continha o DNA plasmidial foi transferido para outro tubo. Adicionou-se 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), e centrifugou-se por 5 min. A fase superior foi coletada e transferida para um tubo de microcentrífuga novo. Adicionou-se 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitou-se com o vórtex e centrifugou-se por 1 min. A fase aquosa superior foi coletada e transferida para outro tubo. Foram adicionados 1 mL de etanol absoluto (100%), misturados por inversão, e incubados a -20°C por meia hora. O DNA foi centrifugado por 5 min e o etanol foi descartado, sendo adicionados 500 µL de 70% etanol. Agitou-se no vórtex seguindo de centrifugação a 12000 g por 5 min, sendo o etanol descartado e o *pellet* seco. O DNA foi ressuspendido em 50 µL de 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA (TE), contendo 50 µg/mL RNase A.

#### 4.10 Sequenciamento dos fragmentos

As reações de seqüenciamento foram realizadas no termociclador GeneAmp PCR System 9700 em reações de 10 µL contendo 100 ng de DNA plasmidial; 3 µL de 2,5X tampão *Save Money* (200 mM Tris-HCl, pH 9.0; 5 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O); 1 µL do kit *DYEnamic<sup>TM</sup> ET Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences); 0,25 µM do iniciador universal T7; e

água ultrapura (Milli-Q) estéril. A reação de seqüenciamento foi realizada com 30 ciclos de 20 s a 95°C; 15 s a 50°C; 1 min a 60°C, finalizados com 10 min a 4°C. Os produtos amplificados foram precipitados com 60 µL de 100% etanol e 2 µL de 3 M acetato de sódio, centrifugados por 45 min em 8000 g a 4°C, seguido por lavagem com 150 µL de 70% etanol, centrifugado novamente por 15 min e a secagem do *pellet* foi realizada a 37°C por 1 h. O precipitado foi então ressuspenso em tampão de seqüenciamento (80% (v/v) formamida deionizada; 20% *loading buffer*), para carregamento em gel de poliacrilamida para análise em seqüenciador automático ABI-3100 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA).

Os cromatogramas gerados foram examinados para a presença de vetor com a ferramenta Vecscreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>), e as sequências resultantes foram submetidas à busca por similaridade no GenBank através de *BlastN* e *BlastX* (MCGINNIS; MADDEN, 2004) para confirmação da sequência obtida.

#### 4.11 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico teve como base o protocolo descrito por Doyle e Doyle et al. (1990), adaptado por Sereno et al. (2005). Utilizou-se cerca de 150 mg de tecido foliar macerados em nitrogênio líquido e cerca de 1 mL de tampão de extração [2% CTAB (m/v); 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA pH 8,0; 1% PVP (m/v); 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,2% β-mercaptoetanol (v/v) e 0,1 mg mL<sup>-1</sup> de proteinase K] incubados a 55°C por 60 min. Adicionou-se 1 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v) e centrifugou-se por 30 min a 8000 g. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado (repetindo esta etapa mais uma vez), e para que ocorresse a precipitação do DNA, adicionou-se o mesmo volume de isopropanol gelado; centrifugando-se por 5 min a 8000 g. O DNA foi lavado com 1 mL de 70% etanol e depois de seco, o *pellet* foi ressuspenso em 30 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA) contendo 10 µg/mL de ribonuclease a 37°C por 30 min. O DNA foi quantificado no fluorômetro *DyNA Quant 2000 fluorometer* (*Amersham Biosciences*, Buckinghamshire, Reino Unido).



#### 4.12 Amplificação dos cDNAs e DNA genômico

Para observar a presença de íntron nas seqüências genômicas de *T. cacao*, procedeu-se duas reações de amplificação, uma com cDNA e outra com DNA genômico no termociclador GeneAmp PCR System 9700. A primeira reação foi montada dentro dos seguintes parâmetros: 1 µL de cDNA diluído em 1:10 (v/v), 0,2 mM de dNTPs, 5 µM de cada iniciador (*Forward* e *Reverse*), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U da enzima *Taq* polimerase, 10x *Taq buffer* com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (750 mM Tris-HCl, pH 8.8; 200mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) – (Fermentas) e água ultrapura (Mili-Q) estéril, totalizando 25 µL de reação. A segunda reação foi realizada nos mesmos padrões, mas com 5 ng/µL de DNA genômico ao invés do cDNA. O programa iniciou com uma desnaturação a 95°C por 2 min, seguidos por 40 ciclos de 95°C a 30 s, 60°C a 30 s, 72°C a 20 s terminando com extensão de 72°C a 5 min. A reação foi colorida com 2 µL *SYBR-gold* visualizados em gel 1,5% agarose, tampão SB e eletroforese a 3 V cm<sup>-1</sup>. Para certificação do tamanho do fragmento utilizou-se marcador de peso molecular GeneRule 100 pb DNA *Ladder* (Fermentas).

#### 4.13 Amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

As análises de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) foram realizadas em termociclador centrífugo RotorGene 3000 (*Corbett Research*, Austrália), a partir de diluições do cDNA total derivado da transcrição reversa (RT) das amostras de RNA. As reações de amplificação foram realizadas no volume final de 10 µL utilizando-se 1µL de cDNA na diluição 1:10 (v/v); 5 µM dos iniciadores gene-específicos; 5µL de *Platinum SYBR-green qPCR SuperMix-UDG 2X* (Invitrogen). As amplificações foram conduzidas em incubações iniciais de 50°C por 2 min, 95°C por 2 min e seguidas de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 15 s e 72 °C por 20 s, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Após o término dos ciclos de reações, foram determinadas as curvas de dissociação de cada produto amplificado entre 72°C e 95°C (curva de *melting*). Foram realizadas três repetições de cada amplificação, todos os experimentos incluíram controle negativo (água, sem DNA molde), e a eficiência de amplificação de cada par de iniciadores

foi determinada pela curva de eficiência com três diluições seriadas do *pool* de cDNA das amostras de embrião de sementes, utilizados nas diluições 1:10; 1:100 e 1:100 ou 1:10; 1:20 e 1:40 (v/v).

A análise da curva de eficiência da diluição serial do *pool* de cDNA das amostras, além de determinar a eficiência dos *primers*, também serviu como referencial para se estabelecer o *threshold*. O coeficiente  $R^2$  resultante foi considerado ideal com valores acima de 0,98; o valor de M (inclinação da reta) entre -3 e -4 foi considerado aceitável, sendo seu ótimo em torno de 3,6. A eficiência ideal deve ter valor igual a 1, o que corresponde a uma eficiência de amplificação = 2 (dobrando a cada ciclo), ou seja, 100%, no entanto, foi considerado satisfatório valores entre 82 e 100%. A aquisição dos dados em tempo real foi efetuada com o programa *RotorGene Real-Time Analysis 6.0* (Corbett Research, Austrália).

### **Delineamento do experimento**

Foram realizados dois ensaios para o estudo da expressão gênica. No primeiro ensaio, a expressão gênica foi avaliada em triplicatas das 11 amostras de sementes de cacau nos diferentes estágios de maturação para cada um dos 12 pares de genes alvo e sete pares de possíveis genes referência. Essas sementes foram designadas como: 60 DAP (60), 70 DAP (70), 80 DAP (80), 90 DAP (90), 100 DAP (100), 110 DAP (110), 120 DAP (120), 130 DAP (130), 140 DAP (140), 150 DAP (150) e 160 DAP (160). No segundo ensaio, a expressão gênica foi avaliada em triplicatas de cada amostra dos tecidos estudados, apresentados da seguinte maneira: folhas em expansão (FE), folhas expandidas (FX), flor (F), caule (C), raiz (R), ápice vegetativo (A) e epicarpo (E). O experimento também foi repetido para os 12 pares de genes alvo e sete pares de possíveis genes referência. Ambos os ensaios contaram com uma repetição biológica.

#### 4.14 Seleção dos genes referência

Com base na literatura, foram selecionados sete genes referência potencialmente ideais para a normalização da expressão gênica. Os genes estudados foram os codificadores das proteínas gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), proteína ribossomal L35 (RPL35), actina (ACT), beta tubulina 5 (TUB5), malato desidrogenase (MDH), fator de alongação 1-alfa (EF1 $\alpha$ ) e poliubiquitina (PUB). Os genes codificadores das proteínas carregadoras de acil A (ACP A), proteínas carregadoras de acil B (ACP B) e proteínas carregadoras de acil C (ACP C), também foram analisados como possíveis genes referência. A estabilidade da expressão de cada gene foi calculada pelos softwares *GeNorm* (versão 3.5) (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) e *NormFinder* (versão 0.953) (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>). O Programa *GeNorm* calculou a média da estabilidade da expressão fornecendo um valor (M) e a variação na estabilidade dos melhores pares de genes (V), permitindo a exclusão gradual dos genes menos adequados, ou seja, com menor valor (M). O software *NormFinder* identificou o melhor gene referência e fez um *ranking* com o valor da estabilidade. Utilizando-se o programa *Relative Expression Software Tool* -REST 2005, (versão 1.9.12), (PFAFFL et al., 2006), os genes alvo foram normalizados a partir dos 3 melhores genes referência e a expressão e regulação gênica *up* e *down* foi calculada.

#### 4.15 Extração e metilação de ácidos graxos

A quantidade de material utilizada no processo de extração foi determinada por testes prévios, estipulando-se cerca de 100-600 mg de sementes de cacau, que foram liofilizadas e maceradas em nitrogênio líquido. O material macerado foi transferido para um tubo de extração de 10 x 1,4 cm e foram adicionados 2 mL de uma solução de Metanol e Cloreto de Acetila (20:1 v/v). Adicionou-se 1 mL de hexano absoluto e os frascos foram fechados e incubados em banho-maria a 90°C por 10 min. Após voltarem a temperatura ambiente, adicionou-se 2 mL de água destilada e centrifugou-se a 3300 g. Com o uso de uma pipeta Pasteur, transferiu-se cuidadosamente o sobrenadante para um tubo de cromatografia e este foi armazenado a 20°C até a análise.

#### 4.16 Análise por Cromatografia Gasosa

As amostras metiladas foram analisadas em cromatógrafo a gás modelo Focus CG-Finnigan, com detector de ionização de chama, coluna capilar CP-Sil 88 (Varian), com 100 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno e 0,20 mm de espessura do filme. Foi utilizado hidrogênio como gás de arraste, numa vazão de 1,8 mL/min. O programa de temperatura do forno inicial foi de 70°C, com tempo de espera de 4 min, seguido de rampa a 175°C (13°C/min) com tempo de espera de 27 min, 215°C (4°C/min) tempo de espera 9 min e em seguida aumentando 7°C/min até 230°C, permanecendo por 5 min, num total de 65 min. A temperatura do vaporizador foi de 250°C e a do detector foi de 300°C. Uma alíquota de 1 µL do extrato esterificado foi injetada no cromatógrafo e a identificação dos ácidos graxos foi feita pela comparação dos tempos de retenção e as percentagens dos ácidos graxos foram obtidas através do software – Chromquest 4.1 (*Thermo Electron*, Itália).

Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos das amostras com padrões de ácidos graxos de manteiga. Os padrões utilizados foram BCR-CRM 164, *Anhydrous Milk-Fat Producer: BCR Institute for Reference Materials and Measurements* e *Supelco TM Component FAME Mix, cat 18919 Supelco*, Bellefonte, PA, EUA. Os ácidos graxos foram quantificados por normalização das áreas dos ésteres metílicos e os resultados foram expressos em percentual de área (%).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação de genes associados à via metabólica de biossíntese de ácidos graxos do cacauero

As sequências utilizadas para o estudo dos genes associados à biossíntese de ácidos graxos em *Theobroma cacao* foram obtidas nos bancos de dados *Gene Index* de *T. cacao* DFCI (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>), num banco de genes da UNICAMP (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cacau>), no qual estão depositadas as sequências descritas por Silva (2005); no banco de genes de *Arabidopsis* ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) e na coleção de ESTs de cacau descrita por Argout et al. (2008). A escolha dos genes estudados foi realizada com base em funções fundamentais exercidas na biossíntese de ácidos graxos, e principalmente de ácidos esteárico. Os genes buscados foram: três isoformas da proteína carregadora de acil (ACP A, ACP B e ACP C),  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II (KAS II), duas isoformas da  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase (SAD A e SAD B), Acil-ACP tioesterase A (Fat A), Acil-ACP tioesterase B (Fat B), duas isoformas da acil-CoA sintetase (ACS A e ACS B) e a proteína oleosina (OLEO). Para todos os genes foram identificadas as seqüências correspondentes. A Tabela 5.1 descreve os genes com suas respectivas siglas, os *Reads* ou *Contigs*, possíveis genes e o *e-value* estudados. O prefixo BIEM se refere às sequências gênicas buscadas no banco de genes da UNICAMP, e o prefixo KZO corresponde as sequências de ESTs da coleção de Argout et al. (2008).

Primeiramente, foram obtidas as sequências da proteína carregadora de acil A (ACP A),  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II (KAS II), Acil-ACP tioesterase B (Fat B) e oleosina (OLEO) por meio de busca com palavras-chaves no banco de genes da UNICAMP. Utilizando-se a ferramenta *Blastx* foram confirmadas a identidade destas sequências. Com o uso das palavras-chave, as demais sequências (proteína carregadora de acil B e C,  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase A e B, Acil-ACP tioesterase A, Acil-ACP tioesterase B e acil-CoA sintetase A e B) foram buscadas no banco de genes de *Arabidopsis*, e utilizando-se a ferramenta *Blast* buscou-se as sequências com *e-value* mais próximos aos os genes da coleção de ESTs de cacau obtidas por Argout et al. (2008).

A proteína carregadora de acil é um co-fator indispensável em diversas vias metabólicas primárias e secundárias, incluindo aquelas que sintetizam ácidos graxos,

fosfolipídeos, co-fatores metabólicos e moléculas sinalizadoras (BYERS; GONG, 2007). Todas as plantas possuem isoformas de proteínas carregadoras de acil (BATTEY; OHLROGGE, 1990), e apesar de estarem bem caracterizadas, pouco se sabe sobre a necessidade e função das diversas isoformas no metabolismo de lipídeos. Interações tecido-específicas (OHLROGGE; KUO, 1985 e HLOUSEK-RADOJCIC; POST-BEITTENMILLER; OHLROGGE, 1992), ou organela-específica (SHINTANI; OHLROGGE, 1994) são algumas explicações para estas isoformas.

As enzimas  $\beta$ -cetoacil-ACP sintases são responsáveis pela ligação dois a dois dos átomos de carbono nos grupos acil derivados da acil-Coa ou da acil-ACP. Estas enzimas diferenciam-se, entre outras coisas, pela especificidade de ação no comprimento da cadeia de carbono. No presente estudo, o gene codificador da  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II foi selecionado, pois esta enzima age alongando o substrato ACP-16:0 até ACP-18:0. 16:0-ACP representa o primeiro maior ponto de ramificação na biossíntese de ácidos graxos, o qual também é substrato da acil-ACP tioesterase B, podendo ser também da  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase (CAHOON, 2000).

As enzimas estearoil-ACP desaturasas são responsáveis pela incorporação de duplas ligações entre os átomos de carbonos (SHANKLIN; SOMERVILLE, 1991), sendo codificadas por uma família de genes. Em *Thumbergia alata*, no mínimo três genes codificam esta enzima (CAHOON, et al., 1994); em *Arabidopsis* e arroz, no mínimo quatro genes foram identificados (MEKHEDOV; ILÁRDUYA; OHLROGGE, 2000); enquanto que em soja, dois genes da  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase foram relatados (BYFIELD; XUE; UPCHURCH, 2006; BYFIELD; UPCHURCH, 2007). As tioesterases são enzimas classificadas em duas famílias gerais, chamadas de acil-ACP tioesterase A e acil-ACP tioesterase B, que diferem pelo substrato em que atuam (JONES et al., 1995). Acil-ACP tioesterase A tem preferência por ACP-18:1, e as acil-ACP tioesterase B hidrolisam primeiramente substratos saturados, que possuem de 16 a 18 carbonos (VOELKER, 1996; GINALSKI; RYCHLEWSKI, 2003 e JONES et al., 1995).

Os organismos eucarióticos apresentam inúmeras isoformas da enzima acil-CoA sintetase, que participam no transporte de ácidos graxos livres.

A oleosina foi selecionada para este estudo, pois os triglicerídeos recém sintetizados são armazenados em corpos gordurosos envoltos por proteínas, e as maiores representantes destas são as oleosinas (HUANG, 1992, TZEN; HUANG, 1992 e TZEN et al., 1990). Guilloteau et al. (2003) identificou duas isoformas da oleosina em cacauero (*T. cacao*),

denominadas TCOleo 15.8 e TCOleo 16.9; mas apenas a expressão de uma da isoforma TCOleo 15.8 foi incluída neste trabalho.

Tabela 5.1 – Lista das sequências de genes associados à biossíntese de ácidos graxos obtidas nos bancos de dados, descrevendo os genes presumíveis, identificação dos *reads* ou *Contigs*, anotação presumível, e o seu respectivo *e-value*

Gene	Read /Contig	Anotação presumível do melhor hit	<i>e-value</i>
ACP A	BIEM-NT-001-018-D02-CE.F	gb AAB96840.1  acyl carrier protein precursor [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	1x10 <sup>-44</sup>
	KZ0AAP9YN21FM1	gb AAC27464.1  acyl carrier protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	8x10 <sup>-46</sup>
	KZ0ABA1YN08	gb AAC27464.1  acyl carrier protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	9x10 <sup>-46</sup>
ACP B	KZ0AAQ4YG22FM1	emb CAB63798.1  acyl carrier protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	1x10 <sup>-32</sup>
	KZ0AAV7YM01FM1	emb CAB63798.1  acyl carrier protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	6x10 <sup>-14</sup>
	KZ0ACAA10YN10FM1	emb CAB63798.1  acyl carrier protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	2x10 <sup>-20</sup>
	KZ0ACAA9YN13FM1	emb CAB63798.1  acyl carrier protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	2x10 <sup>-15</sup>
	KZ0AAP10YF21FM1	emb CAB63798.1  acyl carrier protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	6x10 <sup>-33</sup>
	KZ0ABB16YJ11FM1	emb CAB63798.1  acyl carrier protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	5x10 <sup>-30</sup>
	KZ0AAP6YA04FM1	emb CAB63798.1  acyl carrier protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	7x10 <sup>-09</sup>
ACP C	KZ0AAV7YJ06FM1	gb AAM62469.1  acyl carrier protein, putative [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	4x10 <sup>-46</sup>
	KZ0AAT4YN04FM1	gb AAM62469.1  acyl carrier protein, putative [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	5x10 <sup>-46</sup>
	KZ0AAV10YP23FM1	gb AAM62469.1  acyl carrier protein, putative [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	2x10 <sup>-41</sup>
	KZ0AAT5YN04FM1	gb AAM62469.1  acyl carrier protein, putative [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	1x10 <sup>-45</sup>

Continua



<b>Gene</b>	<b>Read /Contig</b>	<b>Anotação presumível do melhor hit</b>	<b>e-value</b>
	KZ0ACAK2YA09FM1	gb AAM62469.1  acyl carrier protein, putative [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	1x10 <sup>-44</sup>
<b>KAS II</b>	BIEM-NT-001-014-C06-CE.F	gb AAA33873.1  chloroplast beta-ketoacyl-ACP synthase precursor [ <i>Ricinus communis</i> ]	3x10 <sup>-67</sup>
<b>SAD A</b>	KZ0AAS8YE23FM1	gb AA Y86086.1  stearyl-ACP desaturase [ <i>Jatropha curcas</i> ]	3x10 <sup>-111</sup>
	KZ0ABE2YI15FM2	gb AA Y86086.1  stearyl-ACP desaturase [ <i>Jatropha curcas</i> ]	2x10 <sup>-80</sup>
<b>SAD B</b>	KZ0AAV9YN21FM1	gb AA Y86086.1  stearyl-ACP desaturase [ <i>Jatropha curcas</i> ]	1x10 <sup>-119</sup>
	KZ0ABE2YI15FM2	gb AA Y86086.1  stearyl-ACP desaturase [ <i>Jatropha curcas</i> ]	2x10 <sup>-80</sup>
<b>Fat B</b>	BIEM-NT-001-001-C01-CE.F	gb AAF02215.1 AF076535_1 palmitoyl-acyl carrier protein thioesterase [ <i>Gossypium hirsutum</i> ]	4x10 <sup>-15</sup>
<b>Fat A</b>	BIEM-NT-001-006-D04-CE.F	gb AAC49002.1  Br FatA1	2x10 <sup>-93</sup>
	KZ0AAQ8YO09FM1	gb ABX82799.1  acyl-ACP thioesterase [ <i>Jatropha curcas</i> ]	1x10 <sup>-52</sup>
	KZ0AAS7YC06FM1	gb ABX82799.1  acyl-ACP thioesterase [ <i>Jatropha curcas</i> ]	4x10 <sup>-72</sup>
	KZ0ABA10YN04FM1	gb ABX82799.1 acyl-ACP thioesterase [ <i>Jatropha curcas</i> ]	6x10 <sup>-54</sup>
	KZ0ABA10YG11FM1	gb ABX82799.1  acyl-ACP thioesterase [ <i>Jatropha curcas</i> ]	6x10 <sup>-25</sup>
<b>ACS A</b>	KZ0AAT10YC21FM1	gb AAO22689.1  putative acyl-CoA synthetase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	5x10 <sup>-100</sup>
	KZ0ACAA9YA14FM1	gb AAO22689.1  putative acyl-CoA synthetase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	3x10 <sup>-93</sup>
	KZ0AAT4YP17FM1	gb AAO22689.1  putative acyl-CoA synthetase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	8x10 <sup>-79</sup>

Continuação

<b>Gene</b>	<b>Read /Contig</b>	<b>Anotação presumível do melhor hit</b>	<b>e-value</b>
<b>ACS B</b>	KZ0AAQ6YG15FM1	dbj BAB40450.1  long-chain acyl-CoA synthetase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	$2 \times 10^{-27}$
	KZ0AAS1YJ07RM1	dbj BAB40450.1  long-chain acyl-CoA synthetase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	$5 \times 10^{-28}$
	KZ0AAP8YI16FM1	dbj BAB40450.1  long-chain acyl-CoA synthetase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	$1 \times 10^{-12}$
<b>OLEO</b>	BIEM-NT-001-008-E03-CE.F	gb AAO65960.1  oleosin [ <i>Corylus avellana</i> ]	$2 \times 10^{-29}$
			Conclusão

## 5.2 Construção dos iniciadores

As sequências obtidas no banco de genes de cacau da UNICAMP, correspondentes aos genes codificadores da proteína carregadora de acil A,  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II, acil-ACP tioesterase tipo B e oleosina foram usadas como molde para o desenho dos iniciadores específicos (Apêndice A). Para a construção dos iniciadores da acil-ACP tioesterase tipo A, foram alinhadas a sequência obtida no banco de genes da UNICAMP e quatro sequências buscadas no banco de genes de cacau de Argout et al. (2008) (Apêndice B). Para os genes da proteína carregadora de acil B, proteína carregadora de acil C,  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase A,  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase B, acil-CoA sintetase A e acil-CoA sintetase B (ACS B), realizou-se o alinhamento das sequências obtidas na coleção de ESTs descrita por Argout et al. (2008). As regiões entre os reads onde apresentavam maior identidade foram usadas para o desenho dos iniciadores. Os iniciadores estão apresentados na Tabela 5.2, juntamente a sigla do gene correspondente, identificação da sequência molde empregada, tamanho do *amplicon*, e detecção da presença de íntron identificada por amplificação em DNA genômico.

Tabela 5.2 - Iniciadores desenhados para os genes da via metabólica de biossíntese de ácidos graxos de *Theobroma cacao*, apontados junto suas respectivas siglas, identificação da sequência de origem, tamanho do *amplicon* e presença ou ausência de íntrons. As sequencias consensuais encontram-se descritas no Apêndice B

<b>Gene</b>	<b>Seqüências</b>	<b>Acesso</b>	<b>Amplicon (PB)</b>	<b>Íntron</b>
ACP A	AAAGCTTCCCCAAAGTCGAT ATTCAACGAGACACCCTTGC	BIEM-NT-001-018-D02-CE.F	236	sim
ACP B	GCAGACAAGATCAGCACAA AAATCAAAGGGCACGACT	consensual	195	
ACP C	TCTTCCCCACACTCTTTTCG AGGCTGCATGGAGATTGAT	consensual	118	
KAS II	GCTTGAAAGCAGAAAATGC TTGCCAATGTAAAGCAGCAG	BIEM-NT-001-014-C06-CE.F	100	sim
SAD A	AAAGCCTTTCATGCCTCCT TCAGCCCAGTTCTCAAAG	consensual	100	
SAD B	GTGCTAGCCTCACCTCTTGG GTTGCCCTTTCTTGGAATGA	consensual	220	
Fat A	ACCATTGCCAATCTCTTGC CTCATGGTGCAGTGGTAG	consensual	93	
Fat B	TCTTTCCGGTCACTTCATCC TGAGCATTTGCCTTGACTTG	BIEM-NT-001-001-C01-CE.F	136	
ACS A	TTCAGCACGGGGAATATGT TGAAGCCCAATCTTCCACT	consensual	157	
ACS B	GCAAAAGCTGTGACTTTGG TTGCGAAATAATCCCTTGC	consensual	105	
OLEO	ATCCTCTCCGGTTTGATCCT AGCCATGAAACCTGTCACC	BIEM-NT-001-008-E03-CE.F	133	

### 5.3 Extração, quantificação e análise de RNA

Foram realizadas polinizações manuais de árvores do acesso PA016 na Estação Experimental de Recursos Genéticos “José Haroldo” (Marituba-PA). Dois a três frutos de *T.cacao* foram coletados aos 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160 dias após a polinização (DAP).

Também foram utilizadas plantas de cacau (*T. cacao*) cultivadas em casa de vegetação, das quais foram coletadas amostras de folhas em expansão (FE), folhas expandidas (FX), caule (C), raiz (R) e ápice vegetativo (A) (Figura 5.1). Amostras de flores (F) e frutos (para a retirada do epicarpo (E)) foram coletadas na plantação de cacau da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

O RNA total foi extraído dos embriões das sementes e dos demais tecidos de *T. cacao* pelo protocolo proposto por Verica et al. (2004) com algumas modificações. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro e visualizado em gel de agarose para a confirmação da integridade (Figura 5.2).

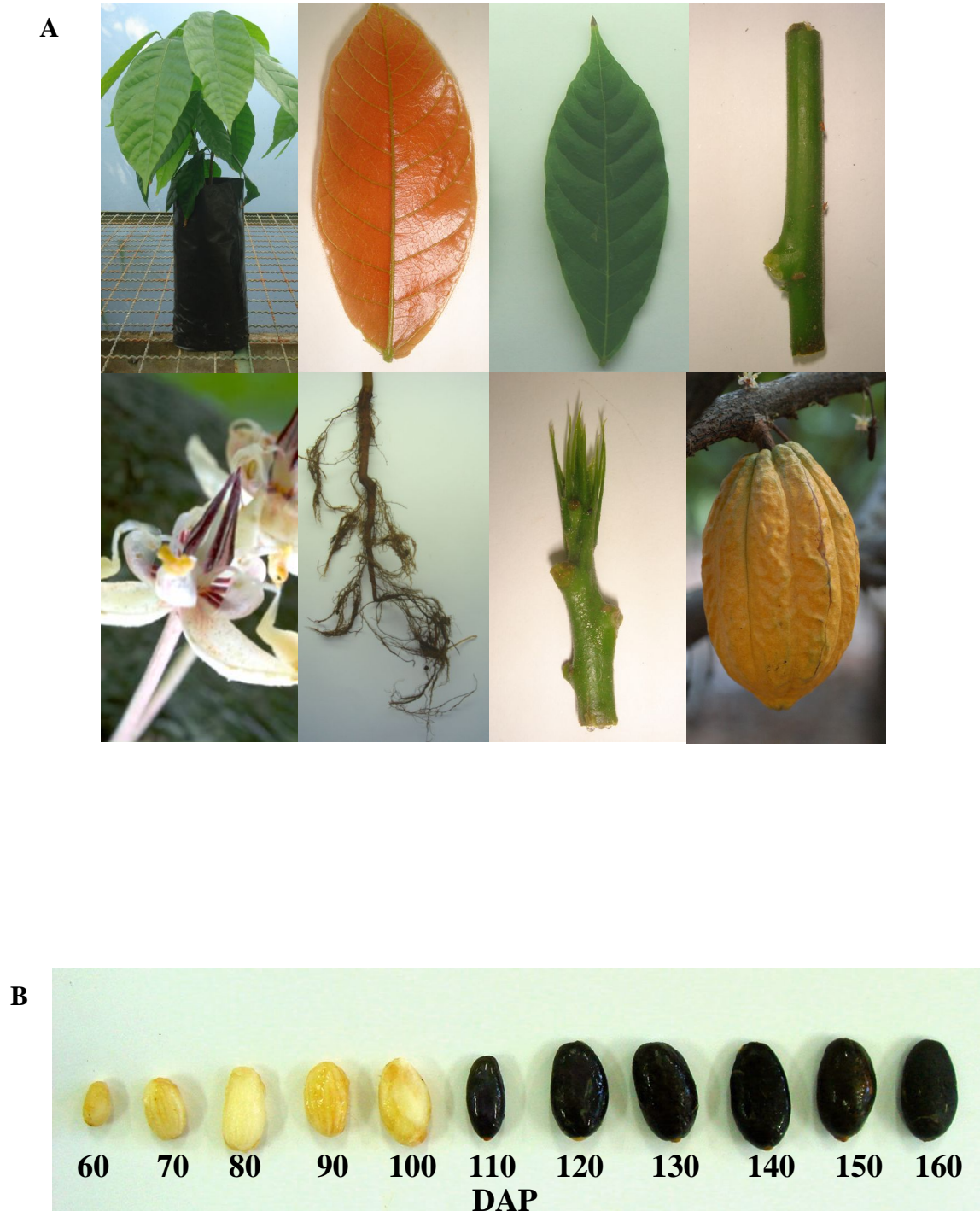


Figura 5.1 – Ilustração dos tecidos de *Theobroma cacao* utilizados neste estudo. Em A: planta de *T. cacao*, folha em expansão (FE), folha expandida (FX), flor (F), caule (C), raiz (R), ápice vegetativo (AP) e epicarpo (E). Em B: embriões nos estágios de desenvolvimento referentes a 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 dias após a polinização (DAP)

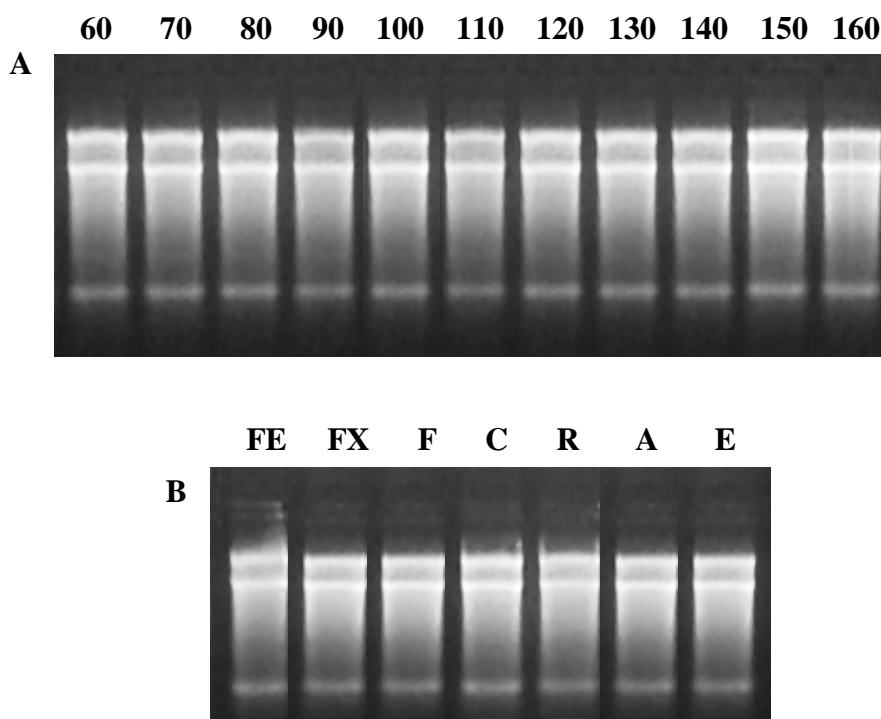


Figura 5.2 - RNA total de *Theobroma cacao*. Em A, RNA extraído dos embriões nos diversos períodos de desenvolvimento: 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 DAP. Em B, RNA oriundo dos tecidos: folhas em expansão (FE), folhas expandidas (FX), flor (F), caule (C), raiz (R), ápice vegetativo (A) e epicarpo do fruto (E)

Conferida a qualidade, e sendo mensurada a quantidade de RNA extraída das amostras, foi realizada a síntese de cDNA. Para testar a eficiência da síntese, as amostras diluídas a 1:10 (v/v) foram submetidas a uma reação de RT-PCR utilizando-se o *primer* do gene da Actina. Outra reação de RT-PCR foi realizada com um *pool* de cDNAs obtidos a partir do RNA extraído dos embriões e em DNA genômico extraído de folhas de *Theobroma cacao*, com o objetivo de testar a especificidade e a presença ou não de íntrons. Todos os *primers* amplificaram os cDNAs e os genômicos, sendo que apenas foi detectada a presença de íntron no fragmento amplificado da proteína carregadora de acil A e  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II (Tabela 5.2).

Em seguida, usando-se os iniciadores construídos, foi realizada reação de RT-PCR, na qual os produtos amplificados foram submetidos à clonagem e sequenciamento para a certificação da identidade do *amplicon*. Os cromatogramas foram analisados utilizando-se as ferramentas *Vecscreen*, *BlastN* e *BlastX*, e todas as sequências foram correspondentes aos fragmentos dos genes de interesse.

#### 5.4 Seleção de genes referência

Com o objetivo de definir genes de referência ou normalizadores apropriado a análise da expressão gênica em sementes em desenvolvimento e em tecidos de cacauero, foi avaliada a estabilidade da expressão de sete genes codificantes de proteínas básicas do metabolismo celular de *Theobroma cacao*, e três genes alvo que possivelmente possuem expressão constitutiva em sementes oleaginosas.

Os genes utilizados nesse experimento (Tabela 5.3) foram os codificadores das enzimas/proteínas gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), proteína ribossomal L35 (RPL35), actina (ACT), beta tubulina 5 (TUB5), malato desidrogenase (MDH), fator de alongação 1-alfa (EF1 $\alpha$ ) e poliubiquitina (PUB), usados frequentemente como referência em estudos de expressão gênica (HONG et al., 2008; PAOLACCI et al., 2009 e CRUZ et al., 2009). Os genes codificadores das proteínas carregadoras de acil A, proteínas carregadoras de acil B e proteínas carregadoras de acil C também foram analisados como possíveis genes referência para expressão em sementes, pois se apresentam em um grande número de cópias em inúmeras vias metabólicas (PEREGRÍN-ALVAREZ et al., 2005).



Tabela 5.3 – Possíveis genes referência e sequência dos iniciadores utilizados

<b>Gene</b>	<b>Sequências</b>
GAPDH	GATGCTCCTATGTTTGTGTGG TCTTCCTCCTCTCCAGTCCTT
RPL35	GTCACTCCGGCTAACATCGT GAAAACCCACAAGGCTTCAG
ACT	TCCTCTTCCAGCCATCTCTC TCTCCTTGCTCATTCGGTCT
TUB5	ATTCCCCGTCTTCACTTCT TCTGCTCATCAACCTCTTTGG
MDH	AAAATGGAGTTGGTGGATGC AACCATGACTGCGATGTTGA
EF1 $\alpha$	AGGTCCACCAACCTTGACTG TTGGGCTCGTTAATCTGGTC
PUB	TTCAGGACAAGGAGGGGATT AGGACAAGATGAAGGGTGGA
ACP A	AAAGCTTCCCCAAAGTCGAT ATTCAACGAGACACCCTTGC
ACP B	GCAGACAAGATCAGCACAA AAATCAAAGGGCACGACT
ACP C	TCTTCCCCACACTCTTTTCG AGGCTGCATGGAGATTGAT

Utilizando-se um *pool* de cDNAs dos embriões das sementes de cacau nas diversas idades, e diluídos a 1:10, 1:100 e 1:100 (v/v), foi estabelecida uma curva de eficiência para cada amplicon. Para o gene codificador da proteína carregadora de acil A, a diluição do cDNA para a construção da curva de eficiência foi realizada em 1:10, 1:20 e 1:40 (v/v). Os valores de eficiência obtidos variaram de 0,74 (genes da malato desidrogenase e poliubiquitina) a 0,99 (gene da proteína carregadora de acil B), e os valores de  $R^2$  foram acima de 0,98 (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Valores de eficiência e  $R^2$  dos candidatos a genes referência obtidos através de curva de eficiência por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

Gene	Eficiência	$R^2$
GAPDH	0,96	0,99
RPL35	0,85	0,98
ACT	0,91	0,99
TUB5	0,95	0,99
MDH	0,74	0,99
EF1 $\alpha$	0,98	0,99
PUB	0,74	0,99
ACP A	0,96	0,99
ACP B	0,99	0,98
ACP C	0,89	0,98

Posteriormente, as amostras de cDNA sintetizadas a partir do RNA extraído de embriões e dos diversos tecidos de *T. cacao*, foram diluídas a concentração de 1:10 (v/v); e submetidas as reações de RT-qPCR. Para o estudo da estabilidade dos possíveis genes referência foram usados os *softwares GeNorm* e *NormFinder*. Esses programas necessitam que os valores de Cts sejam transformados em quantidades relativas (Q). Pela fórmula Delta Ct, a amostra com maior nível de expressão, ou seja, menor Ct, recebe valor 1 e os demais valores são subtraídos desta (VANDESOMPELE et al., 2002).

$$Q = E^{\text{Delta Ct}}$$

$$Q = E^{(\text{Ct min} - \text{Ct amostra})}$$

Q = quantidade relativa;

E = eficiência da amplificação (2 = 100%);

Ct min = menor valor de Ct = Ct da amostra com maior expressão.

Utilizando-se primeiramente o programa *GeNorm*, os valores de estabilidade gênica foram medidos com base nos níveis de expressão não normalizados. Este *software* calcula a variação aos pares em todos os genes, definindo como valor M a média da variação de um

gene em relação a todos os outros. Para todos os possíveis genes, foram determinados os valores M, e o gene referência com melhor estabilidade, é o que possui o menor valor M.

Na avaliação do melhor gene referência para a normalização da expressão gênica em sementes de *Theobroma cacao*, o gene codificador da proteína ribossomal L35 foi considerado o mais estável, com valor M igual a 1,45. Já o gene menos estável e menos adequado para os estudos de expressão em sementes de cacau foi beta tubulina 5, com valor M igual a 3,23 (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 – Candidatos a genes referência analisados em embrião de sementes de *Theobroma cacao* e ranqueados de acordo com o valor de estabilidade (valor M) pelo programa *GeNorm*

<b>Gene</b>	<b>Valor de Estabilidade (M)</b>
RPL35	1,45
ACP A	1,48
GAPDH	1,50
PUB	1,51
MDH	1,71
ACT	1,77
EF1 $\alpha$	2,26
ACP B	2,41
ACP C	2,00
TUB5	3,23

Quando se considerou o par de genes com melhor estabilidade, os genes codificadores da proteína carregadora de acil A e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase foram sugeridos pelo programa. A Figura 5.3 permite a visualização da estabilidade dos genes avaliados.

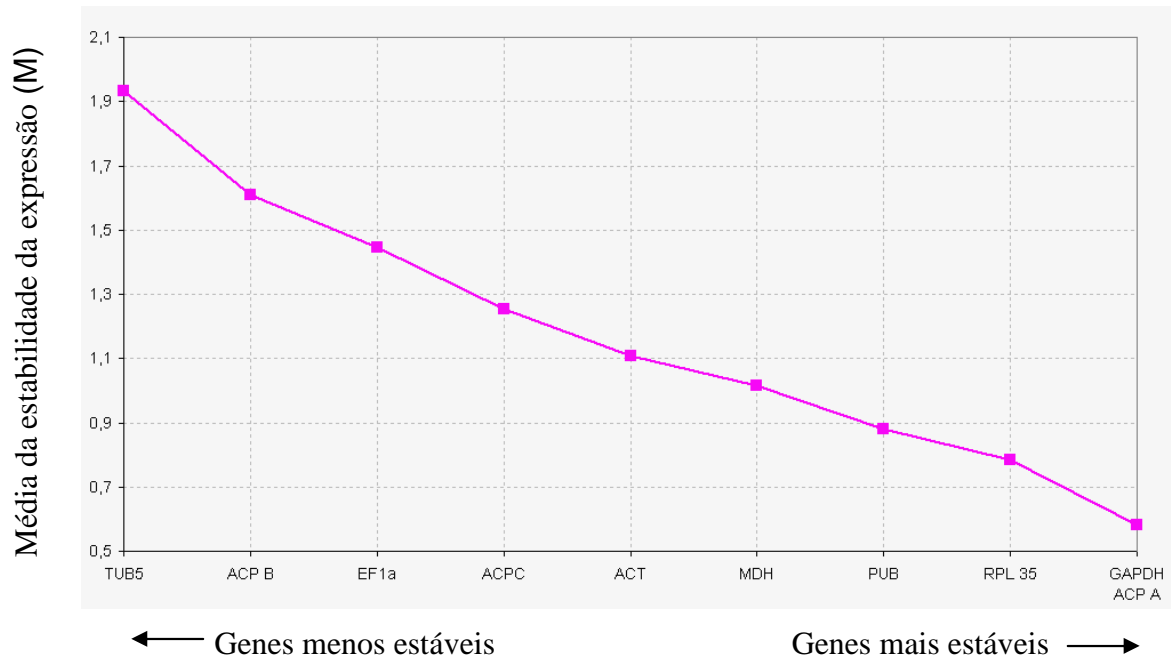


Figura 5.3 – Valores decrescentes de estabilidade dos candidatos a gene referência para o estudo em sementes de *Theobroma cacao* estimado pelo software *GeNorm*

Quando se considerou os diversos tecidos de *Theobroma cacao* (Tabela 5.6), o gene com melhor estabilidade foi a proteína carregadora de acil B, com valor M igual a 2,01 e o menos estável foi o fator de alongação 1-alfa com valor M de 7,25.

Tabela 5.6 – Candidatos a genes referência analisados nos diversos tecidos de *Theobroma cacao* e ranqueados de acordo com o valor de estabilidade (valor M) pelo programa *GeNorm*

Gene	Valor de Estabilidade (M)
ACP B	3,56
GAPDH	3,59
RPL35	3,61
TUB5	4,02
PUBQ	4,03
ACP C	4,06
ACT	4,06
ACP A	4,12
EF1 $\alpha$	7,96

O par de genes com melhor estabilidade foi formado pelos codificadores da proteína carregadora de acil B e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. A Figura 5.4 mostra em valores decrescentes, do gene menos estável, ao par de genes com maior estabilidade.

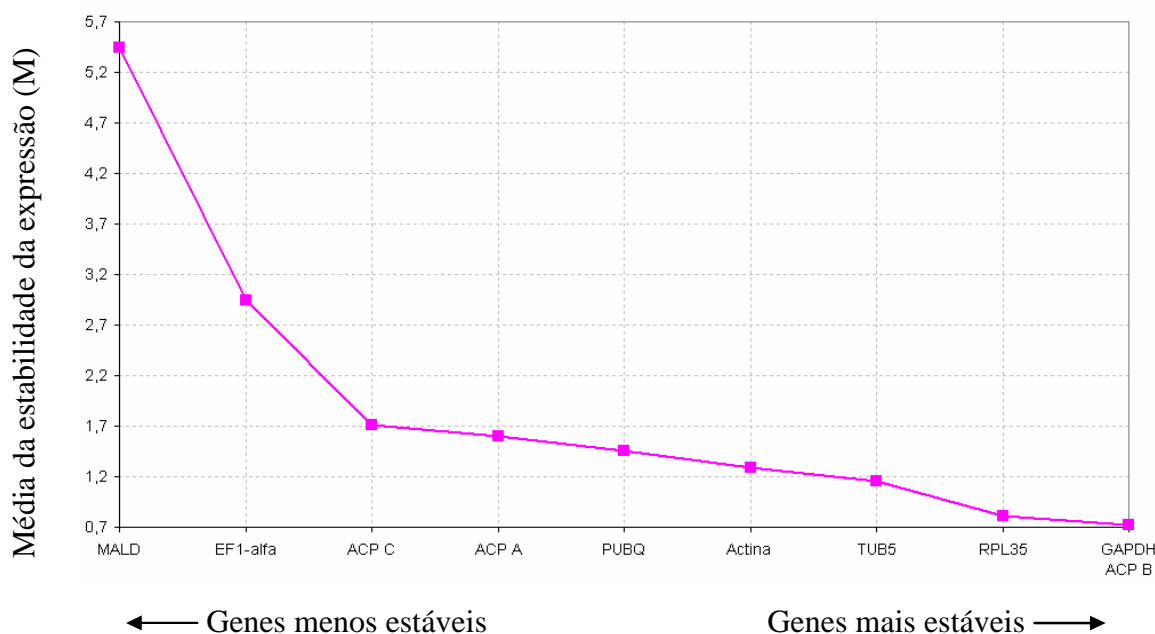


Figura 5.4 – Valores decrescentes de estabilidade dos candidatos a gene referência para o estudo em diversos tecidos de *Theobroma cacao*, obtido pelo software *GeNorm*

Já empregando o *software NormFinder*, calculou-se o valor de estabilidade dos possíveis genes referência nas sementes e nos diversos tecidos de *Theobroma cacao* (Tabela 5.7). Nas sementes, o gene com melhor valor de estabilidade foi da proteína ribossomal L35 com 0,25, seguidos por proteína carregadora de acil A com 0,29; e poliubiquitina com valor de estabilidade igual a 0,33 (Tabela 5.7). O gene menos estável foi beta tubulina 5 que apresentou valor de estabilidade de 2,11 (Tabela 5.7).

Tabela 5.7 – Genes referência analisados em sementes de *Theobroma cacao* e ordenados de acordo com o valor de estabilidade obtido pelo programa *NormFinder*

<b>Sigla</b>	<b>Valor de estabilidade</b>
RPL35	0,25
ACP A	0,29
PUB	0,33
GAPDH	0,33
MDH	0,74
ACT	0,75
ACP C	1,03
EF1 $\alpha$	1,28
ACP B	1,43
TUB5	2,12

Quando a estabilidade na expressão dos genes referência foi avaliada nos diversos tecidos de *Theobroma cacao* pelo programa *NormFinder* (Tabela 5.8), o melhor gene referência apontado foi o codificador da proteína carregadora de acil B, com valor de estabilidade 0,25; seguidos pelo fator de alongação 1-alfa de valor 0,27 e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; com valor de estabilidade de 0,34 (Tabela 5.8). O gene menos indicado para o estudo da expressão quando se considera os tecidos de *Theobroma cacao*, de acordo com *software NormFinder* foi a proteína carregadora de acil C; a qual mostra valor de estabilidade de 1,17 (Tabela 5.8).

Tabela 5.8 – Candidatos a genes referência analisados em diversos tecidos de *Theobroma cacao* e ordenados de acordo com o valor de estabilidade pelo programa *NormFinder*

<b>Sigla</b>	<b>Valor de estabilidade</b>
ACP B	0,25
EF1 $\alpha$	0,27
GAPDH	0,34
MDH	0,42
RPL35	0,57
PUBQ	0,89
ACT	1,07
ACP A	1,09
TUB5	1,12
ACP C	1,17

O resultado obtido nos programas *GeNorm* e *NormFinder* foram similares, porém para a normalização dos dados será levado em consideração os genes propostos pelo *software GeNorm*. Esse critério foi estabelecido porque o programa *NormFinder* apenas fornece o gene mais estável e o *GeNorm* além do gene mais adequado, também informa o par de genes com menores variações.

Para mensurar a expressão gênica com eficácia, os genes alvo devem ser normalizados não apenas com um gene referência, mas sim com no mínimo, os três melhores eleitos pelo programa (VANDESOMPELE et al., 2002). Considerou-se então que para a normalização da expressão gênica avaliada em sementes de *Theobroma cacao*, os três genes mais adequados foram os codificadores da proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil A e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. Para os diversos tecidos de plantas de cacaueteiro, os três melhores genes para se estabelecer a expressão são os codificadores da proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil B e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

### 5.5 Caracterização do perfil de ácidos graxos dos frutos de *Theobroma cacao*

A composição de ácidos graxos dos embriões dos frutos em desenvolvimento empregadas para a análise de expressão gênica foram determinadas de forma a permitir a comparação entre transcrição e fenótipo final observado (composição ácidos graxos). Todos os frutos utilizados para a caracterização do perfil de ácidos graxos foram da variedade PA016, exceto para a amostra de 70 DAP cujo perfil de ácidos graxos foi obtido para a variedade PA195

Foi realizada a extração, derivatização por metilação e análise do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa. Os resultados foram mostrados em porcentagem de ácidos graxos presente embriões analisados nas diversas idades do fruto (Tabela 5.9).

Tabela 5.9 - Perfil de ácidos graxos das sementes de *Theobroma cacao* nos diversos períodos de desenvolvimento. Os valores obtidos entre a relação idade dos frutos e ácido graxo é mostrada em porcentagem (%)

<b>Tempo (DAP)</b>	<b>Palmítico (16:0)</b>	<b>Esteárico (18:0)</b>	<b>Oleico (18:1)</b>	<b>Linoleico (18:2)</b>	<b>Linolênico (18:3)</b>	<b>Gadoleico (20:1)</b>
<b>60</b>	31,6	2,3	7,4	44,5	5,3	-
<b>70</b>	34,4	8,3	19,2	27,4	3,3	0,4
<b>80</b>	28,4	2,8	7,2	38,9	5,1	-
<b>90</b>	32,2	3,8	9,3	39,6	5,4	-
<b>100</b>	34,9	3,2	7,3	41,7	7,1	-
<b>110</b>	37,0	26,3	28,4	4,0	0,9	1,0
<b>120</b>	31,0	37,0	24,7	3,1	0,6	0,8
<b>130</b>	29,7	39,7	24,1	2,7	0,6	0,8
<b>140</b>	30,0	37,6	27,1	2,4	0,5	0,4
<b>150</b>	29,0	38,6	26,9	2,7	0,5	0,7
<b>160</b>	29,4	38,7	26,1	3,0	0,5	0,6



O início do desenvolvimento dos embriões das sementes de *Theobroma cacao* corresponde a uma discreta acumulação de lipídeos de membrana, ricos em ácidos graxos insaturados. Nesse período, a quantidade de lipídeos de membrana supera a quantidade de triglicerídeos de reserva (LEHRMAN; KEENEY, 1980). Desta maneira, o ácido linoleico (18:2) contribui com a maior parte dos lipídeos totais até 100 DAP. Após os 110 DAP, houve aumento significativo na quantidade de ácidos esteárico (18:0) e oleico (18:1) e diminuição de ácido linoleico. Esse padrão manteve-se até o final do desenvolvimento, aos 160 DAP. Esse resultado foi semelhante ao estudo de Patel, Shanklin e Furtek (1994), onde analisando o perfil lipídico de sementes de cacau em desenvolvimento, constatou aumento de ácido esteárico e oleico entre 95 e 115 DAP. O resultado da análise da porcentagem lipídica realizada por Lehman e Keeney (1980), também mostraram troca na composição de ácidos graxos no mesmo período, com aumento de ácido esteárico e oleico, que após os 115 DAP, acumularam-se na mesma proporção. Griffiths e Harwood (1991) analisando a regulação da biossíntese de triglicerídeos em cacau perceberam a mesma tendência na acumulação de triglicerídeos.

A análise do perfil de ácidos graxos dos frutos de 70 DAP mostrou dados discrepantes como alta porcentagem de esteárico (18:0) e oleico (18:1) e baixa quantidade de ácido linoleico (18:2). Isso pode ter sido ocorrência do fato da amostra de 70 DAP ter sido derivada de outro genótipo (PA195), com desenvolvimento de fruto distinto, ou com problemas de imprecisão de determinação do estágio de desenvolvimento.

## **5.6 Determinação da eficiência dos iniciadores específicos dos genes da via metabólica de ácidos graxos de *Theobroma cacao***

Utilizando-se um *pool* do cDNA dos embriões em desenvolvimento de *Theobroma cacao*, diluições seriadas a 1:10, 1:100 e 1:1000 (v/v) foram realizadas com o objetivo de estabelecer uma curva de eficiência para cada amplificador específico dos diversos genes. Para os genes codificadores da  $\Delta^9$  esteroil-ACP desaturase B e proteína carregadora de acil B foram realizadas diluições nas concentrações 1:10, 1:20 e 1:40 (v/v).

Os valores de eficiência obtidos variaram de 0,82 (gene codificador da  $\Delta^9$  esteroil-ACP desaturase B) a 1,0 ( $\Delta^9$  esteroil-ACP desaturase A), e os valores de correlação  $R^2$  foram acima de 0,98 (Tabela 5.10).

Tabela 5.10 – Valores de eficiência e  $R^2$  dos genes da via metabólica de lipídeos de *Theobroma cacao*, obtidos através de curva de eficiência por RT-qPCR

Gene	Eficiência	$R^2$
ACP A	0,96	0,99
ACP B	0,99	0,98
ACP C	0,89	0,98
KAS II	0,98	0,98
SAD A	1,0	0,99
SAD B	0,82	0,98
Fat B	0,91	0,98
Fat A	0,93	0,98
ACS A	0,99	0,99
ACS B	0,99	0,99
OLEO	0,98	0,99

### 5.7 Análise da expressão gênica nos embriões de *Theobroma cacao* nos diversos estágios de desenvolvimento

Segundo Vandersompele et al. (2001), para medir a expressão gênica com acurácia, devem-se usar múltiplos genes referência, sendo que o mínimo ideal são os três genes referência mais estáveis. Alguns modelos matemáticos foram desenvolvidos para o cálculo da expressão relativa, os quais podem ou não usar a correção da eficiência (PFAFFL, 2001; SOONG et al., 2000 e KENNETH, THOMAS, 2001). Como se optou previamente pelo uso dos três genes mais estáveis (proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil A e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) para a normalização da expressão dos genes de interesse, o programa REST 2005 (versão 1.9.12) foi adotado. Os valores de Ct foram então transformados em valores de concentração.

$$\text{Concentração} = \text{eficiência}^{\text{média (controle)} - \text{média (amostras)}}$$

Após serem transformados em valores de concentração, é necessário calcular a média geométrica da concentração dos três genes referência, como forma de minimizar os possíveis valores discrepantes e as diferenças entre eles. Os valores de concentração do gene alvo são então divididos pela média geométrica (GEOMEAN) dos genes referência, obtendo-se assim o valor de expressão:

$$\text{Expressão} = \text{Concentração do gene de interesse} \div \text{GEOMEAN} (\text{Conc.ref1}, \text{Concref2}, \text{Concref3})$$

Os dados de expressão gênica foram então calculados por quantificação relativa, a qual necessita além do gene referência, uma amostra como referência, ou seja, como tratamento controle ou calibrador para a determinação da expressão (PFAFFL, 2001). Para isso, como controle interno da expressão foi estabelecido o Ct obtido das sementes de *T. cacao* no menor tempo de desenvolvimento, 60 DAP, que recebeu valor de expressão igual a 1. O período referente a 60 DAP foi escolhido como controle pois assume-se que nesse estágio de desenvolvimento os embriões de cacauetiro estariam ainda sem acúmulo de reserva de gordura (LEHRIAN; KEENEY, 1980). Os dados da Tabela 5.9 corroboram esta justificativa, mostrando os níveis mais baixos de lipídeos de reserva. As sementes nos seus respectivos estágios de amadurecimento são mostradas na Figura 5.1. A expressão relativa dos embriões nos diversos estágios de desenvolvimento: 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 DAP, foram então comparadas à expressão mensurada nos diversos tecidos da planta de *Theobroma cacao*.

### 5.7.1 Expressão gênica das proteínas carregadoras de acil em embriões de *Theobroma cacao*

A proteína carregadora de acil é um co-fator indispensável em diversas vias metabólicas primárias e secundárias, incluindo aquelas que sintetizam ácidos graxos, fosfolípidos, co-fatores metabólicos e moléculas sinalizadoras (BYERS; GONG, 2007). Quase todos os ácidos graxos encontrados nas membranas lipídicas ou como reserva nas sementes, são sintetizados com a participação da proteína carregadora de acil plastidial (SCHMID; OHLROGGE, 2002). Segundo Mekhedov, Ilárduya e Ohlrogge (2000) existem diferentes isoformas desta proteína nas plantas, as quais são codificadas diferencialmente por muitos genes e expressam-se diferencialmente nos diversos tecidos e organelas da planta.

As três isoformas estudadas, classificadas de acordo com a similaridade com genes de *Arabidopsis*, apresentaram de modo geral a tendência de expressão constante durante todo o desenvolvimento dos embriões, com exceções em alguns tempos de amostragem (Figura 5.5; Figura 5.6). O perfil de expressão nas sementes de *Theobroma cacao* sugeriram que estas proteínas poderiam ser consideradas com expressão constitutiva. Hlousek-Radojic, Post-Beittenmiller e Ohlrogge (1992) estudou padrões de expressão de isoformas de proteínas carregadoras de acil em *Arabidopsis*, identificando proteínas tecido-específicas e outras que podem ser consideradas constitutivas, por possuírem padrão de expressão constante como os apresentados neste estudo. Chen et al. (2007) obteve resultados semelhantes quando estudou o perfil e a expressão dos genes relacionados a síntese de ácidos graxos em mamona (*Ricinus communis*). A expressão gênica da proteína carregadora de acil,  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II (KAS II) e  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase não mostraram mudanças significativas durante o amadurecimento dos frutos.

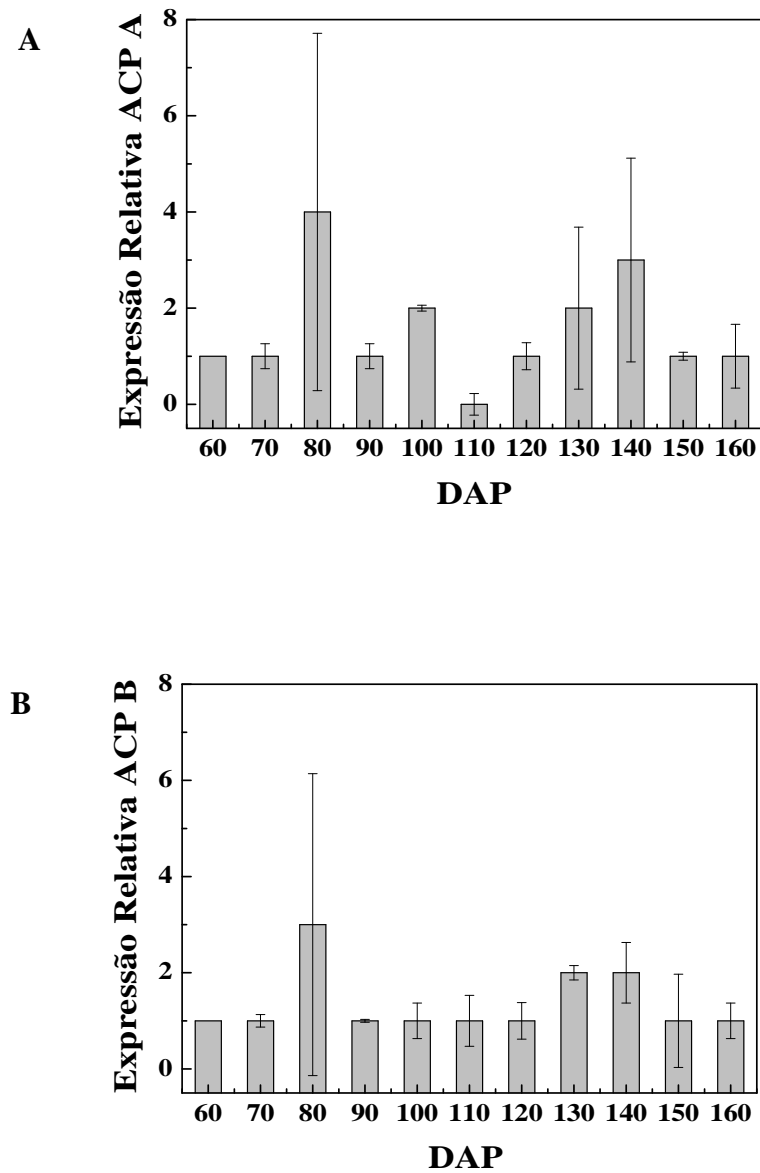


Figura 5.5 – Expressão relativa das isoformas da proteína carregadora de acil A e B, em relação aos genes-referência proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil A e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, analisados em embriões de *Theobroma cacao* nos estágios de desenvolvimento em 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 dias após a polinização (DAP), empregando como normalizador embriões de 60 DAP. Em A: expressão gênica da isoforma proteína carregadora de acil A (ACPA). Em B: expressão gênica da isoforma proteína carregadora de acil B (ACP B)

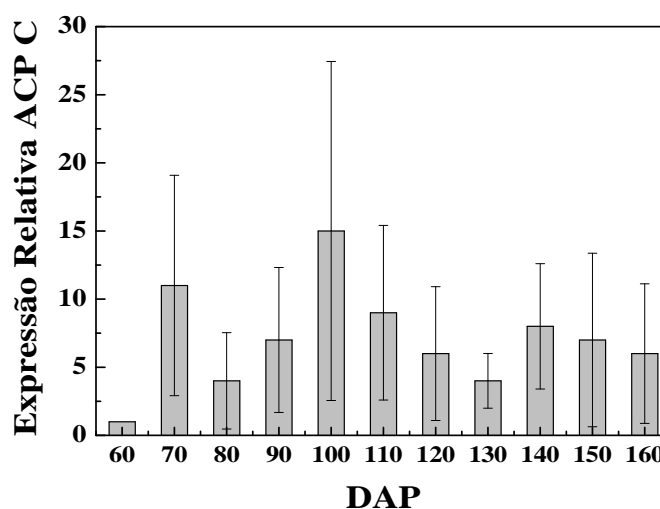


Figura 5.6 – Expressão relativa da isoforma proteína carregadora de acil C, em relação aos genes-referência proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil A e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, analisados em embriões de *Theobroma cacao* nos estágios de desenvolvimento em 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 dias após a polinização (DAP), empregando como normalizador embriões de 60 DAP.

As proteínas carregadoras de acil A e B mostraram quantidades inferiores de transcritos quando comparadas a proteína carregadora de acil C (Figura 5.5; Figura 5.6)). Os transcritos referentes a proteína carregadora de acil C foram os mais abundantes entre todos codificadores para as proteínas do sistema FAS (Sintase de ácidos graxos). Esse perfil também foi observado por Mekhedov, Ilárduya e Ohlrogge (2000), que analisando sequências de EST de arroz e *Arabidopsis*, detectou a maior abundância de transcritos das proteína carregadora de acil T14153 e E48B2Y7, quando comparada a outras enzimas do complexo Sintase de Ácidos Graxos (FAS). Esse fato é justificado por ser indispensável e estar presente em inúmeras vias metabólicas (BYERS; GONG, 2007).

Alguns estudos consideram que a expressão diferencial das isoformas da proteína carregadora de acil podem estar relacionadas a especificidade das vias a que pertencem. Em *Arabidopsis*, a ACP-4 foi mais ativa na membrana lipídica fotossintética de tecidos em crescimento (BONAVENTURE; OHLROGGE, 2002), enquanto que em algodão, as proteínas carregadoras de acil Fiber3A, 7A e 8A foram específicas na elongação de fibras (SONG; ALLEN, 1997). Já em coentro, a ACP-1 foi específica para síntese de ácido graxo monoenoico (SUH et al., 1999), e em pimenta, ACP- ACL mostrou-se ativa na biossíntese de capsaicinoides (ALURU et al., 2003).

Devido à sensibilidade da técnica RT-qPCR usada para o estudo da expressão neste trabalho, o intervalo de confiança mostrou-se grande, impossibilitando muitas vezes de confirmar significância nos resultados. As amostras referentes às sementes de 80 DAP quando quantificadas em todos os genes estudados da via metabólica de ácidos graxos, mostraram desvio padrão acima da média; o que pode ser justificado por problemas na normalização da expressão para uma das repetições biológicas.

### 5.7.2 Expressão da $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II (KAS II) em embriões de *Theobroma cacao*

A enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II atua na síntese de ácidos graxos alongando a cadeia carbônica especificamente no último passo de condensação, onde o esqueleto de carbono passa de 16 para 18 átomos (HARWOOD, 1996). Houve uma tendência de acúmulo de transcritos aos 100 DAP. Entre 70 e 90 DAP, os valores de expressão foram próximos a 1. Entre 110 e 120 DAP, houve queda em relação ao pico de 100 DAP, seguido de tendência de queda no acúmulo de transcritos, com repressão na expressão entre 150 e 160 DAP (Figura 5.7).

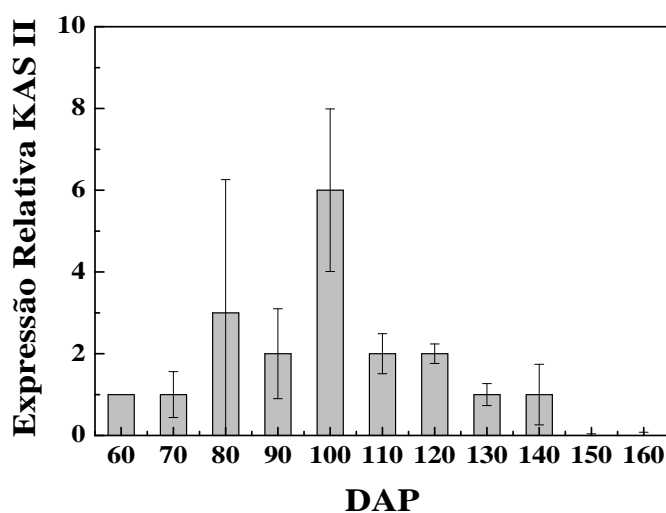


Figura 5.7 – Expressão relativa da  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II em relação aos genes-referência proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil A e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, analisados em embriões de *Theobroma cacao* nos estágios de desenvolvimento em 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 dias após a polinização (DAP), empregando como normalizador embriões de 60 DAP

Hakosaki et al. (2008) estudando a expressão da  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II em *Arabidopsis*, concluíram que esta enzima pode ter diversas funções nos tecidos e nos embriões de semente em vários estágios de desenvolvimento, sendo expressa na folha, flor, caule; mas principalmente nos cotilédones dos embriões das sementes (medidas em diversos estágios de desenvolvimento). A expressão da  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II pode ser considerada tecido-específica para embriões. Comparando-se o estudo de Hakosaki et al. (2008) com os resultados obtidos neste estudo em *Theobroma cacao*, percebeu-se que a especificidade por tecidos embrionários também acontece. Isto sugere que a enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II (KAS II) possui importante papel no desenvolvimento embrionário.

Pidkowich et al. (2007), usando mutantes de *Arabidopsis fab1-1* (heterozigoto parcialmente deficiente para o gene codificador da  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II) e *fab1-2* (homozigoto, totalmente deficiente para o gene codificador da  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II), comprovou que modulando somente a atividade tecido-específica de  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II (KAS II) pode-se aumentar a concentração de ácidos graxos com 18 carbonos.

### 5.7.3 Expressão das $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturases em embriões de *Theobroma cacao*

As estearoil-ACP desaturases são enzimas que agem especificamente em cada substrato, no comprimento das cadeias carbônicas, introduzindo dupla ligação entre esses átomos (SHANKLIN; SOMERVILLE, 1991). Nas plantas, a formação da insaturação do 18:1 é catalisada pela enzima  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase. Estas enzimas são codificadas por uma família de genes, e no presente trabalho foi estudada a expressão de duas isoformas  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase A e B. As duas isoformas estudadas, classificadas de acordo com a similaridade com genes de *Arabidopsis*, mostraram padrão de expressão semelhante, com tendência de aumento entre 90 e 120 DAP (Figura 5.8).

A expressão da isoforma  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase A mostrou tendência de aumento a partir de 100 DAP ( $2,2 \pm 1,0$ ), chegando a  $2,8 \pm 0,3$  em 120 DAP. Analisando-se a isoforma  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase B, houve tendência de aumento da expressão a partir de 100 DAP ( $3,4 \pm 0,8$ ), até atingir um pico em 120 DAP seguido de diminuição gradativa até 140 DAP. Os valores de expressão relativa no período de 80 DAP em ambas as enzimas



desviou da tendência observada, tendo sido considerado que essa amostra mostrou resultados discrepantes em todos os genes analisados (Figura 5.8).

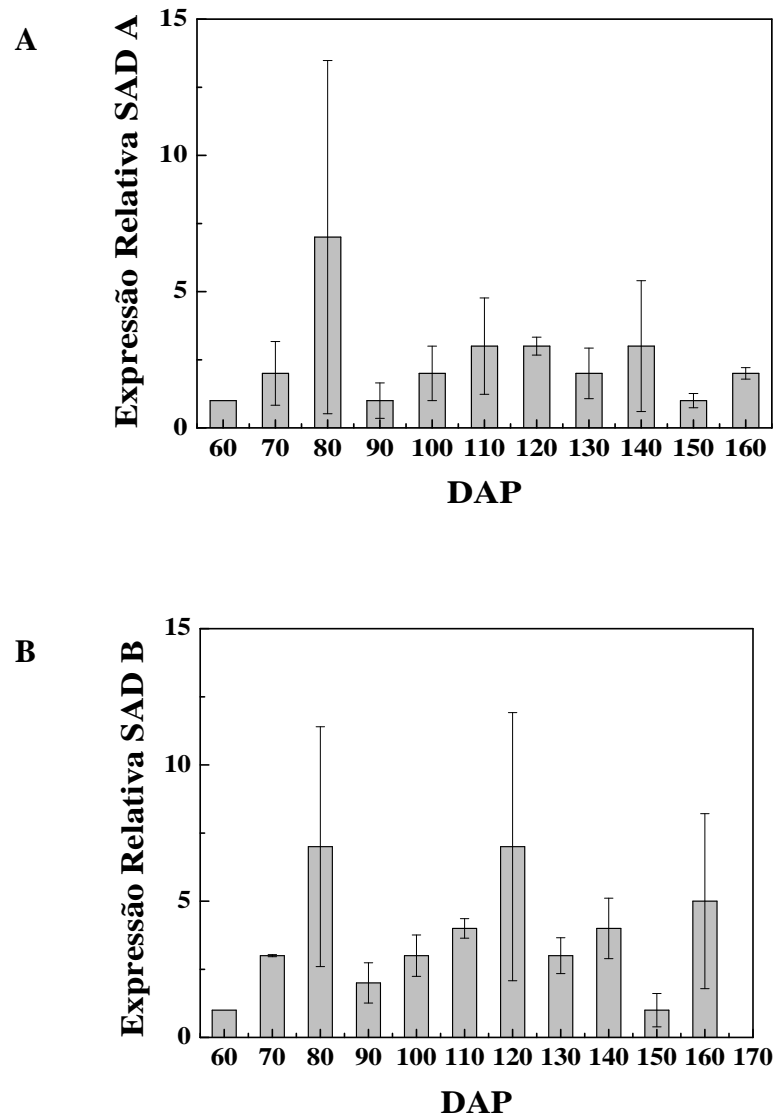


Figura 5.8 – Expressão relativa das isoformas da  $\Delta^9$  estearoil-ACP desaturase em relação aos genes-referência proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil A e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, analisados em embriões de *Theobroma cacao* nos estágios de desenvolvimento em 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 dias após a polinização (DAP), empregando como normalizador embriões de 60 DAP. Em A: expressão gênica da isoforma  $\Delta^9$  estearoil-ACP desaturase A (SAD A). Em B: expressão gênica da isoforma  $\Delta^9$  estearoil-ACP desaturase B (SAD B)

Patel (1993) determinou os níveis protéicos de  $\Delta^9$  estearoil-ACP desaturase por *western blot* em embriões de *T. cacao* de 95 a 145 DAP. Neste estudo, a desaturase mostrou

expressão dos 95 DAP até 105 DAP, quando ocorreu o maior acúmulo de estearato. Os níveis da enzima aos 95 dias foi 2,3 vezes maior do que aos 105 dias, e após 145 DAP, não houve mais detecção de transcritos, devido a falta de sensibilidade da técnica usada. A autora concluiu que a diminuição nos ácidos graxos insaturados e aumento de 18:0 nesse período de 20 dias (95 a 115 DAP) pode ocorrer mesmo com intensa produção de  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase. Duas hipóteses são consideradas: ou a  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase pode não conseguir insaturar todos os substratos estearoil-ACP, ou as acil-ACP tioesterases hidrolisam rapidamente os estearoil-ACP, não fornecendo substrato para a ação das desaturases.

#### **5.7.4 Expressão das acil-ACP tioesterases A e B (Fat A e Fat B) em embriões de *Theobroma cacao***

As tioesterases são enzimas que possuem a função de clivar as ligações tioesters do grupo acil ligado a coenzima A, liberando os ácidos graxos. Estas enzimas são divididas em duas classes, de acordo com o substrato a que têm especificidade: acil-ACP tioesterase A com preferência por 18:1-ACP e acil-ACP tioesterase B que hidrolisam primeiramente substratos saturados, que possuem de 16 a 18 carbonos (VOELKER,1996; GINALSKI; RYCHLEWSKI, 2003 e JONES et al., 1995).

A expressão de transcritos para ambas as enzimas foram temporalmente semelhantes atingindo pico de acúmulo de transcritos a 110 DAP, mas com a acil-ACP tioesterase A apresentando maior quantidade relativa de transcritos. A acil-ACP tioesterase B mostrou tendência de aumento de expressão a partir de 90 DAP ( $1,4 \pm 0,7$ ), chegando a  $4,8 \pm 1,7$  aos 110 DAP, diminuindo drasticamente aos 150 DAP ( $0,4 \pm 0,0$ ) (Figura 5.9). A expressão da acil-ACP tioesterase A mostrou aumento de expressão a partir de 90 DAP ( $3,2 \pm 1,9$ ), com ápice da acumulação de transcritos em 110 DAP ( $14,6 \pm 4,5$ ), e diminuindo gradativamente até 150 DAP, onde a expressão mostra o valor de  $0,8 \pm 0,2$ . (Figura 5.9).

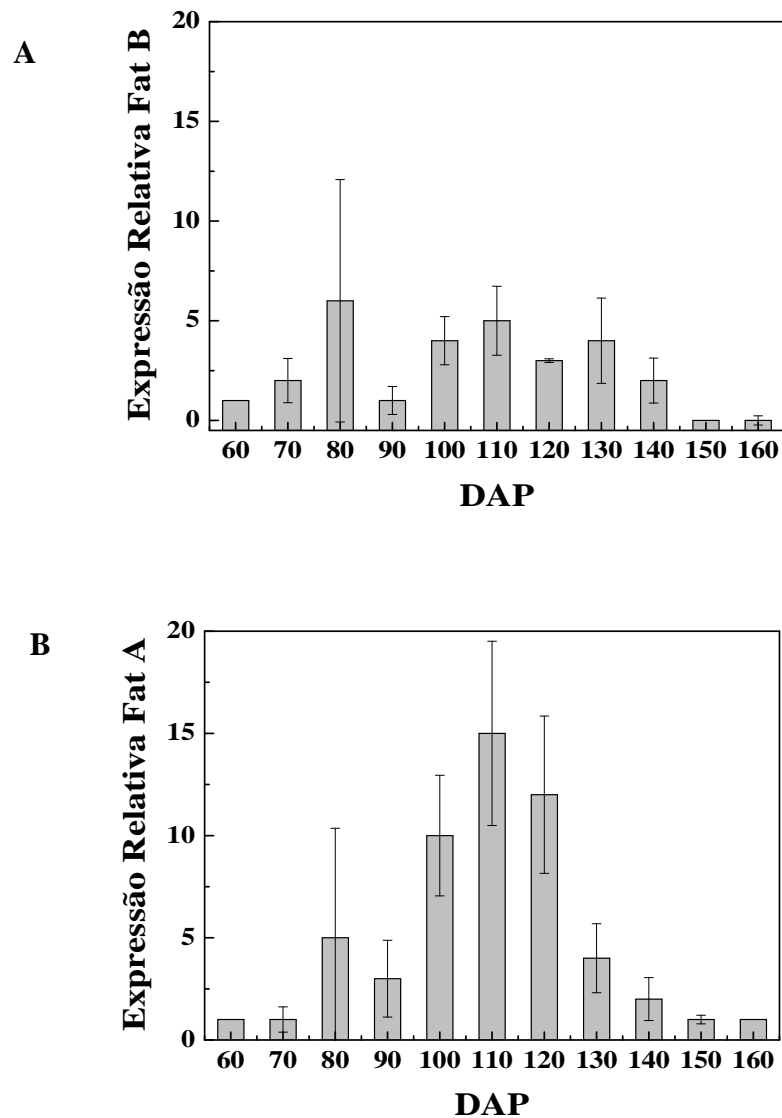


Figura 5.9 – Expressão relativa das tioesterases em relação aos genes-referência proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil A e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, analisados em embriões de *Theobroma cacao* nos estágios de desenvolvimento em 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 dias após a polinização (DAP), empregando como normalizador embriões de 60 DAP. Em A: expressão gênica da acil-ACP tioesterase B (Fat B). Em B: expressão gênica da acil-ACP tioesterase A (Fat A)

Os resultados aqui obtidos corroboraram os dados de Silva (2005), pois estudando a expressão das acil-ACP tioesterase A e acil-ACP tioesterase B por *northern blot* durante o desenvolvimento de sementes de cacau, também percebeu padrão de expressão temporal semelhante entre as duas enzimas. Ambas as enzimas se expressaram precocemente em

embriões no desenvolvimento de frutos de cacau, a partir dos 60 dias. A expressão dos genes dobrou entre 60 e 120 dias. A acil-ACP tioesterase A apresentou maior expressão entre 100 e 120 dias de desenvolvimento, enquanto que a acil-ACP tioesterase B, também, apresentou maior expressão aos 120 dias, porém a partir dos 130 dias houve diminuição no nível de expressão, que se manteve praticamente constante até os 150 dias.

### 5.7.5 Expressão acil-CoA sintetase (ACS) em embriões de *Theobroma cacao*

Após as tioesterases liberarem os ácidos graxos do grupo acil da coenzima A e deixarem o plastídeo, estes são re-esterificados a CoA pela enzima acil-CoA sintetase, para assim serem transportados até o retículo endoplasmático, onde irão participar da biossíntese dos lipídeos de membrana e de reserva (MILLAR; SMITH; KUNST, 2000).

As duas isoformas estudadas, classificadas de acordo com a similaridade com genes de *Arabidopsis*, apresentaram padrão temporal de expressão distintos. A expressão da acil-CoA sintetase A apresentou pico de expressão a partir dos 100 dias ( $11,3 \pm 1,8$ ) significativamente diferente em relação aos períodos anteriores permanecendo alta em 110 ( $5,8 \pm 1,0$ ) e 120 DAP ( $7,2 \pm 0,4$ ). No período 130 DAP, houve queda na expressão ( $1,3 \pm 0,0$ ), permanecendo reduzida até o final do desenvolvimento (Figura 5.10).

A expressão da acil-CoA sintetase B mostrou-se baixa dos 70 aos 90 DAP (Figura 5.9), Aos 100 DAP a expressão gênica passa a ser significativa em relação aos períodos anteriores ( $30,6 \pm 3,3$ ), aumentando aos 110 dias ( $140,4 \pm 71,8$ ) e alcançando os maiores valores de expressão em 130 ( $158,9 \pm 63,2$ ) e 140 DAP ( $198,3 \pm 63,2$ ), após decréscimo aos 120 DAP. Em 150 e 160 dias, houve queda da expressão (Figura 5.10).

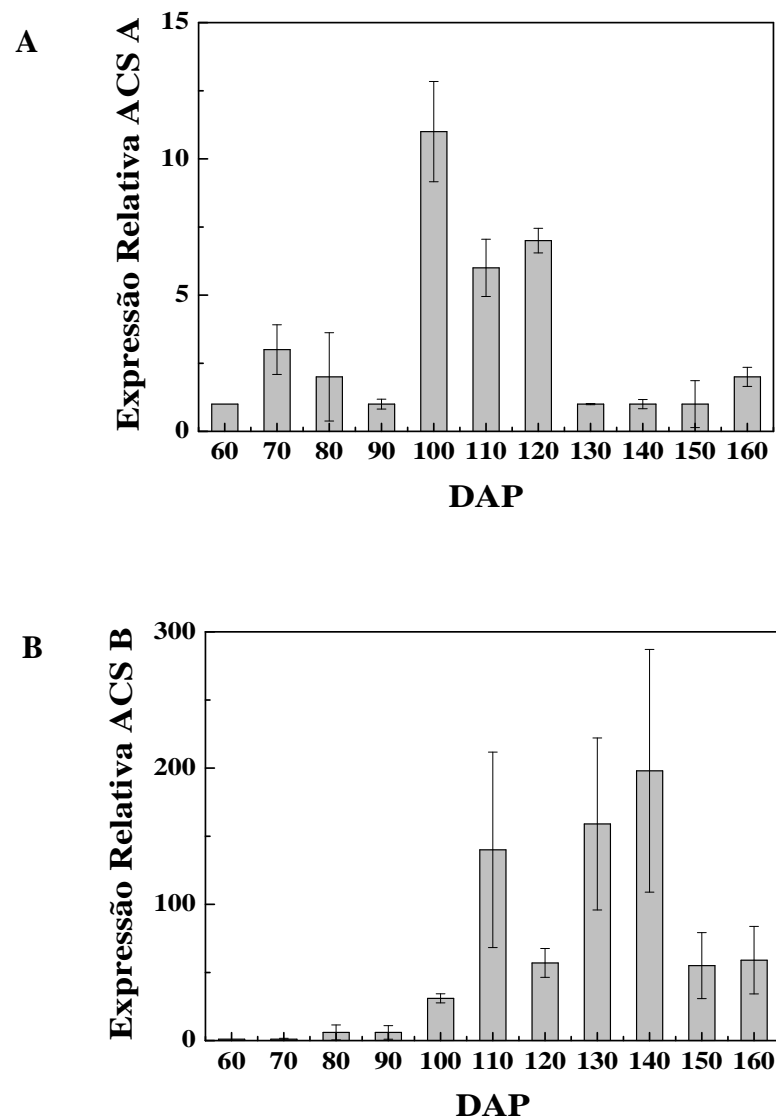


Figura 5.10 – Expressão relativa das isoformas da acil-CoA sintetase em relação aos genes-referência proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil A e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, analisados em embriões de *Theobroma cacao* nos estágios de desenvolvimento em 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 dias após a polinização (DAP), empregando como normalizador embriões de 60 DAP. Em A: expressão gênica da isoforma acil-CoA sintetase A (ACS A). Em B: expressão gênica da isoforma acil-CoA sintetase B (ACS B)

Shockey et al. (2002) estudaram isoformas de acil-CoA sintetase em *Arabidopsis* priorizando a expressão desse gene no desenvolvimento de sementes. Com o uso da técnica de RT-PCR semi-quantitativo, foi confirmado que diversas isoformas de LACS expressaram-se durante o desenvolvimento das sementes, mas apenas uma mostrou-se tecido-específica. As acil-CoA sintetase A e B medidas em sementes de *Theobroma cacao*, mostraram padrão de

expressão diferentes. Enquanto acil-CoA sintetase A mostrou-se mais expressa nos períodos de 100 a 120 DAP, a isoforma acil- CoA sintetase B foi mais expressa de 110 a 140 DAP. A semente em desenvolvimento é o lugar de depósito de triglicerídeos de reserva e onde existe uma demanda de ácidos graxos para suportarem as aciltransferases que produzem esses lipídeos. Ambas acil-CoA sintetase A e B são expressas nos períodos de maior síntese de triglicerídeos, sendo que a primeira isoforma está presente no início e a segunda no fim deste processo.

### **5.7.6 Expressão Oleosina (OLEO) em embriões de *Theobroma cacao***

As sementes oleaginosas estocam os triglicerídeos em estruturas esféricas denominadas corpos gordurosos. Estes corpos medem cerca de 0,5-2,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro e são envoltos por uma monocamada lipídica coberta por uma membrana protéica (HUANG, 1996; JOLIVET et al., 2004; LIN et al., 2002; NAESTED et al., 2000; TZEN et al., 1997; TZEN et al., 1993) e as oleosinas são as maiores componentes destas (TZEN et al., 1990).

O gene codificador da proteína oleosina de 15.8 KDa apresentou expressão reprimida entre 60 e 80 DAP (Figura 5.11). Aos 90 DAP, houve aumento significativo na expressão, e a partir desse período houve um importante acúmulo de transcritos, com pico a 110 DAP ( $17114,6 \pm 15926,0$ ). Em 120 DAP, a expressão passa a diminuir, mas mantendo expressão aos 150 e 160 DAP (Figura 5.11).

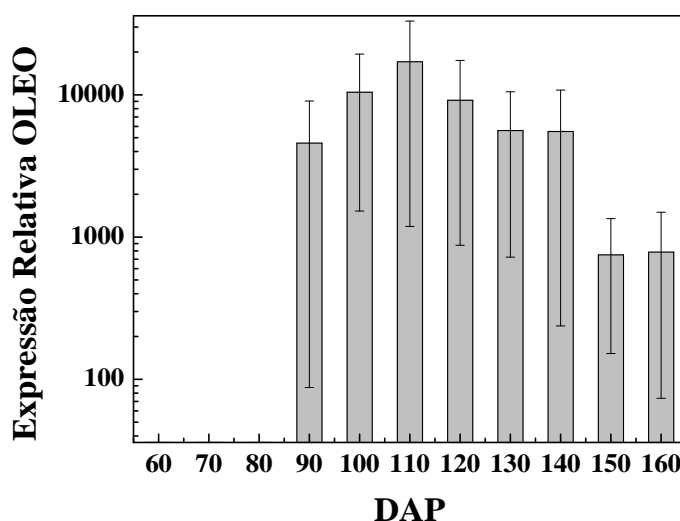


Figura 5.11 – Expressão relativa da oleosina (OLEO) em relação aos genes-referência proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil A e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, analisados em embriões de *Theobroma cacao* nos estágios de desenvolvimento em 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 dias após a polinização (DAP), empregando como normalizador embriões de 60 DAP

Simkin et al. (2006) analisaram cinco isoformas de oleosinas em duas variedades de café, detectando que quando se compara a expressão de sementes e outros tecidos, há maior expressão de oleosina durante o desenvolvimento das sementes.

Guilloteau et al. (2003) estudou por *northern* a expressão de duas oleosinas com cadeia polipeptídica de aproximadamente 15 e 16.1 KDa. Essas oleosinas forma denominadas TCOleo 15.8 e TCOleo 16.9 KDa. A oleosina TCOleo 15.8 foi a mesma estudada no presente trabalho, e o padrão de expressão obtido por Guilloteau et al. (2003) com transcritos fortemente expressos entre 125 e 146 DAP, seguido de diminuição na expressão após 160 DAP, foi semelhante ao aqui obtido.

O período de máxima acumulação de oleosina coincide com o período de intensa metabolização de triglicérides, podendo-se especular que estes são essenciais para que não ocorra a junção dos corpos oleosos no período de intensa acumulação.

## 5.8 Análise da expressão gênica nos tecidos de *Theobroma cacao*

Com o objetivo de investigar a especificidade ou preferência de expressão de alguns genes em tecidos de cacaueteiro, foi realizada análise de expressão dos genes em oito tecidos, buscando demonstrar a especificidade de certos genes ao processo de acúmulo de lipídeos de reserva em embriões de cacaueteiro.

### 5.8.1 Expressão das proteínas carregadoras de acil A, B e C (ACP A, ACP B e ACP C) nos diversos tecidos de *Theobroma cacao*

As proteínas carregadoras de acil A, B e C, em geral mostraram padrão de expressão constante, com pouca variação entre os tecidos (Figura 5.12; Figura 5.13)). Para o transcrito da proteína carregadora de acil A, houve expressão em folha em expansão, folha expandida, caule, ápice vegetativo e embrião de 150 DAP, que mostraram-se reprimidas em relação ao normalizador (embriões aos 60 DAP). A média de transcritos que obteve o maior valor de expressão foi no epicarpo do fruto ( $4,2 \pm 3,3$ ) (Figura 5.12).

A proteína carregadora de acil B mostrou valores de expressão ainda mais homogêneos entre tecidos. Em folha em expansão o valor de expressão foi  $1,3 \pm 0,9$ ; em folha em expandida,  $1,0 \pm 0,1$ ; caule,  $1,4 \pm 0,7$ ; raiz,  $1,6 \pm 0,8$ ; ápice vegetativo,  $0,8 \pm 0,2$ ; epicarpo,  $1,1 \pm 0,2$ ; embrião de 120 DAP,  $0,8 \pm 0,4$  e 150 DAP,  $1,2 \pm 1,0$ , (Figura 5.12).

Por outro lado, a proteína carregadora de acil C apresentou maior variação e quantidade de transcritos nos tecidos. Os valores de expressão nos tecidos estudados foram: folha em expansão  $9,6 \pm 7,4$ ; folha expandida,  $10,9 \pm 3,9$ ; flor,  $2,9 \pm 1,1$ ; caule,  $8,8 \pm 7,2$ ; raiz,  $3,2 \pm 1,3$ ; ápice vegetativo,  $4,3 \pm 3,3$ , semente com 120 DAP,  $5,8 \pm 4,9$  e semente com 150 DAP,  $6,8 \pm 6,4$ . A média da expressão do epicarpo mostrou o maior valor ( $31,3 \pm 30,6$ ) (Figura 5.13).

Os níveis de expressão da proteína carregadora de acil podem ser proporcionais a biossíntese de ácidos graxos em tecidos vegetativos e reprodutivos em crescimento, o que justifica sua expressão nos diversos tecidos (BAERSON; LAMPPA, 1993; BONAVENTURE; OHLROGGE, 2002; HANNAPEL; OHLROGGE, 2002 e OHLROGGE; KUO, 1984).



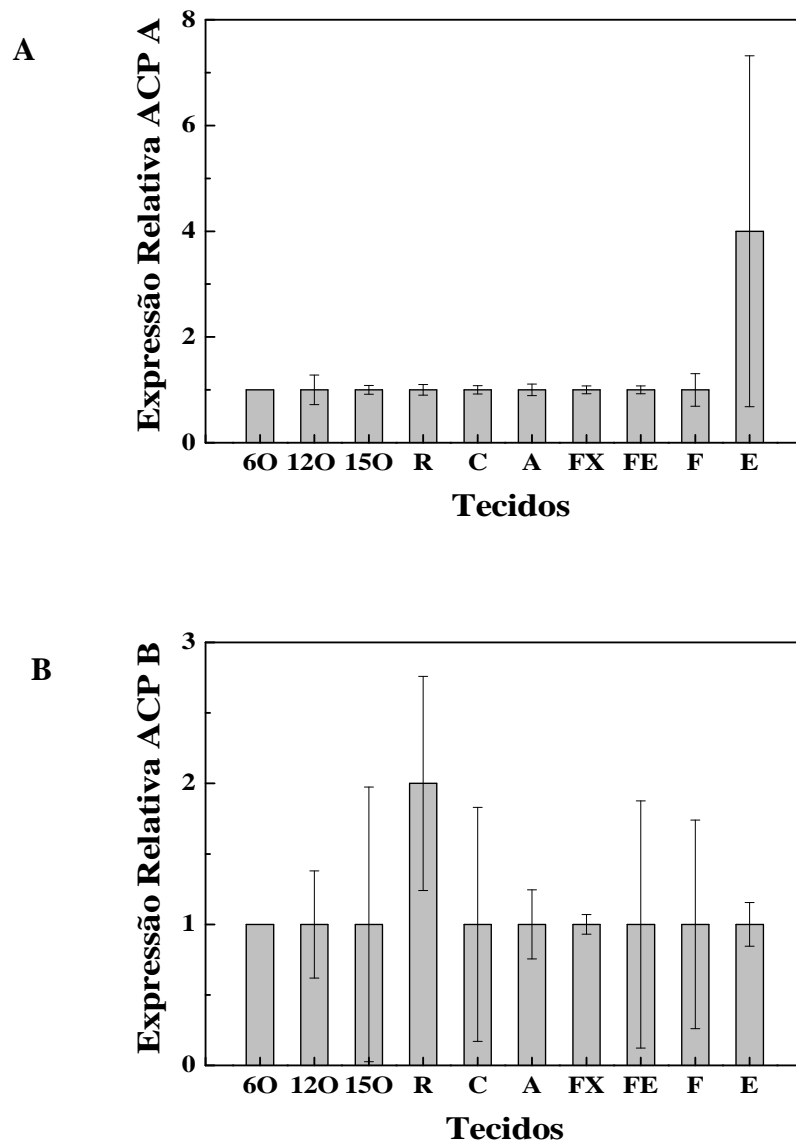


Figura 5.12 – Expressão relativa das isoformas das proteínas carregadoras de acil A e B, em relação aos genes-referência proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil B e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, analisados nos tecidos de *Theobroma cacao* nos estágios de desenvolvimento em 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 dias após a polinização (DAP), empregando como normalizador, embriões de 60 DAP. Eixo X: Embrião de 60 DAP (6O), embrião de 120 DAP (12O), embrião de 150 DAP (15O), raiz (R), caule (C), ápice vegetativo (A), folha expandida (FX), folha em expansão (FE), flor (F) e epicarpo (E). Eixo Y: valores relativos de expressão correspondentes. Em A: expressão relativa da isoforma proteína carregadora de acil A (ACP A). Em B: expressão relativa da isoforma proteína carregadora de acil B (ACP B)

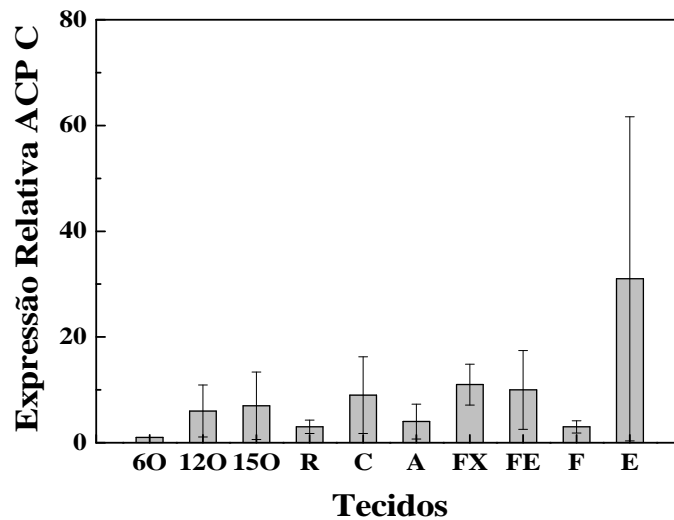


Figura 5.13 – Expressão relativa da isoforma da proteína carregadora de acil C, em relação aos genes-referência proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil B e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, analisados nos tecidos de *Theobroma cacao* nos estágios de desenvolvimento em 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 dias após a polinização (DAP), empregando como normalizador, embriões de 60 DAP. Eixo X: Embrião de 60 DAP (6O), embrião de 120 DAP (12O), embrião de 150 DAP (15O), raiz (R), caule (C), ápice vegetativo (A), folha expandida (FX), folha em expansão (FE), flor (F) e epicarpo (E). Eixo Y: valores relativos de expressão correspondentes.

### 5.8.2 Expressão da $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II (KAS II) nos diversos tecidos de *Theobroma cacao*

A enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II apresentou expressão constante em todos os tecidos, sendo a única exceção em embriões a 120 DAP ( $1,8 \pm 0,2$ ). (Figura 5.14). Hakozi et al. (2008) analisou a expressão da  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II em diferentes tecidos de *Arabidopsis* com o uso da técnica de RT-PCR e com a inserção de GUS no promotor desse gene. Esta enzima foi expressa em folhas, flores abertas, botões florais, caule e fortemente nos estágios embrionários da semente, mas em raiz não houve expressão. De forma similar, a  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II estudada no presente trabalho, mostrou especificidade para embriões em desenvolvimento.

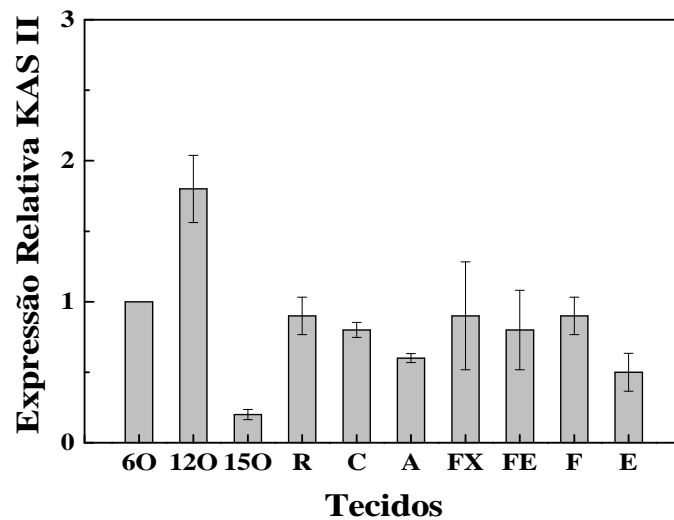


Figura 5.14 – Expressão relativa  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II em relação aos genes-referência proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil B e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, analisados nos tecidos de *Theobroma cacao* nos estágios de desenvolvimento em 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 dias após a polinização (DAP), empregando como normalizador, embriões de 60 DAP. Eixo X: Embrião de 60 DAP (6O), embrião de 120 DAP (12O), embrião de 150 DAP (15O), raiz (R), caule (C), ápice vegetativo (A), folha expandida (FX), folha em expansão (FE), flor (F) e epicarpo (E). Eixo Y: valores relativos de expressão correspondentes

### 5.8.3 Expressão das esteroil-ACP desaturase nos diversos tecidos de *Theobroma cacao*

$\Delta^9$ esteroil-ACP desaturase A demonstrou expressão em todos os tecidos com exceção do ápice vegetativo ( $0,2 \pm 0,1$ ). Nos embriões de 120 e 150 DAP, os valores foram  $2,8 \pm 0,3$  e  $0,9 \pm 0,3$  respectivamente (Figura 5.15).

A enzima  $\Delta^9$ esteroil-ACP desaturase B apresentou expressão em quase todos os tecidos, a não ser no ápice vegetativo ( $0,2 \pm 0,1$ ) e epicarpo ( $0,1 \pm 0,1$ ). (Figura 5.15) sugerindo tratar-se de uma enzima com expressão preferencial em embriões.

Whitney et al. (2003) isolou e estudou por *northern blot* desaturases de *Bassia scoparia*, onde observou que a  $\Delta^9$ esteroil-ACP desaturase foi expressa nos tecidos das sementes e também em folha e raiz, não sendo considerada tecido-específica. Esse resultado é contrastante ao padrão de expressão da  $\Delta^9$ esteroil-ACP desaturase B, a qual mostra-se preferencial para embriões, com pico de expressão aos 120 DAP.

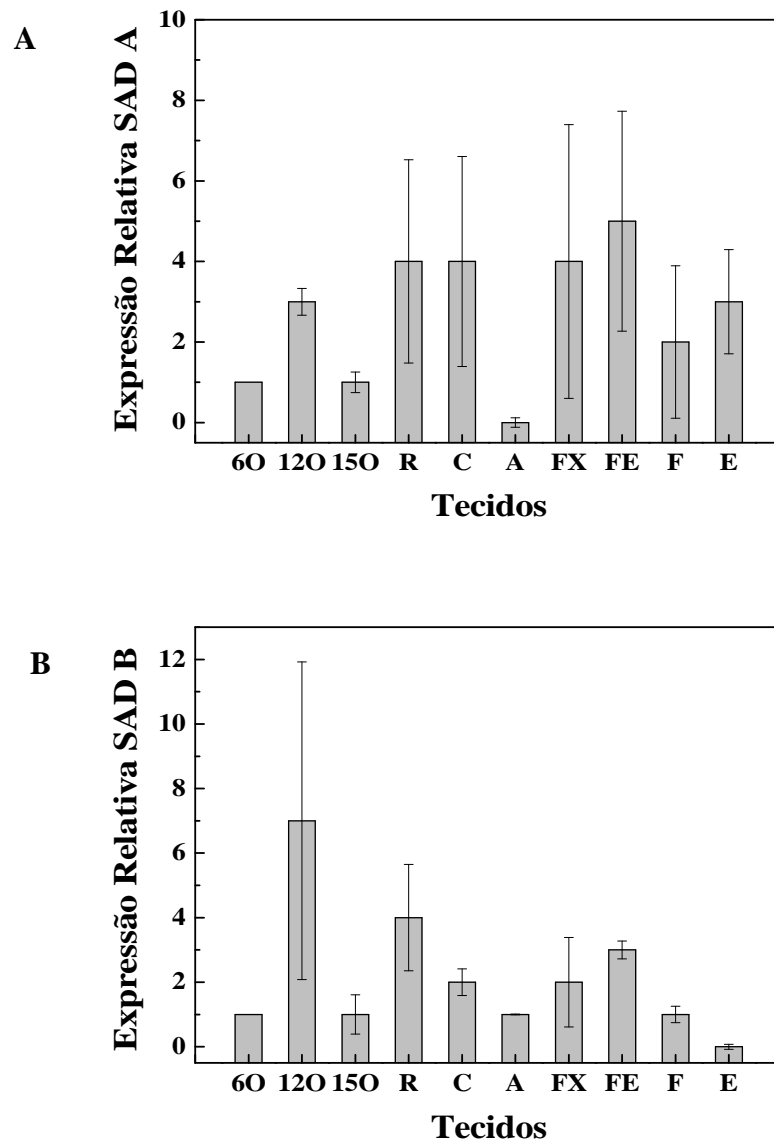


Figura 5.15 – Expressão relativa das isoformas da  $\Delta^9$  estearoil-ACP desaturase em relação aos genes-referência proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil B e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, analisados nos tecidos de *Theobroma cacao* nos estágios de desenvolvimento em 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 dias após a polinização (DAP), empregando como normalizador, embriões de 60 DAP. Eixo X: Embrião de 60 DAP (60), embrião de 120 DAP (120), embrião de 150 DAP (150), raiz (R), caule (C), ápice vegetativo (A), folha expandida (FX), folha em expansão (FE), flor (F) e epicarpo (E). Eixo Y: valores relativos de expressão correspondentes. Em A: expressão relativa da isoforma  $\Delta^9$  estearoil-ACP desaturase A (SAD A). Em B: expressão relativa da isoforma  $\Delta^9$  estearoil-ACP desaturase B (SAD B)

#### 5.8.4 Expressão das acil-ACP tioesterase A e B (Fat A e Fat B) nos diversos tecidos

A acumulação de transcritos de acil-ACP tioesterase A foi significativamente maior em embriões de 120 DAP ( $11,7 \pm 3,9$ ) em relação a todos os tecidos (Figura 5.16). O mesmo foi observado para os transcritos de acil-ACP tioesterase B, com pico para embriões 120 DAP. Para os outros tecidos a expressão foi constante (Figura 5.16).

Dormann, Voelker e Ohlrogge (1995) analisaram a expressão da acil-ACP tioesterase B em diversos tecidos, concluindo que esta enzima apesar de ser tecido-específica em sementes, também é expressa em folhas, raiz e vagem de *Brassica napus*, o que corresponde exatamente ao observado neste estudo em *T. cacao*. Eccleston e Ohlrogge (1998) analisaram mais uma vez a expressão da acil-ACP tioesterase B com maior expressão em flores do que em folhas. Quando o mesmo estudo foi realizado em *Arabidopsis*, percebeu-se que a maior expressão era novamente em flores e fraca expressão em sementes. Dormann, Voelker e Ohlrogge (2005) utilizando-se transgênicos de *Arabidopsis* o qual possuíam aumento de 16:0, perceberam uma acil-ACP tioesterase B tecido específica proporcional a quantidade de 16:0, expressa em sementes e flores, e uma segunda acil-ACP tioesterase B específica para flores e folhas. Este estudo pode sugerir que a acil-ACP tioesterase B estudada, é específica para sementes e fracamente expressa em folhas em expansão, flores, caule e raiz o que também corrobora os dados observados em *T. cacao*.

Mandal et al. (2002) analisaram a expressão das acil-ACP tioesterase A e B em *Brassica juncea*, em sementes em desenvolvimento, raiz, folha e hipocótilo, demonstrando que o transcrito foi intensamente expresso em embriões em desenvolvimento, mas nos demais tecidos nada foi detectado. Esse resultado também confirma o presente estudo em *Theobroma cacao*, onde esta enzima foi pouco expressa ou reprimida nos tecidos a não ser na semente de 120 DAP.

Silva (2005) mensurou espacialmente em *T. cacao* os genes de Acil-ACP tioesterase A e B, os quais se expressaram em tecido foliar e sementes, porém não apresentaram expressão importante em ápice vegetativo e em raiz. O uso da técnica *northern blot*, por possuir sensibilidade menor do que a RT-qPCR, pode não ter acusado expressão em raiz, como foi apresentada neste trabalho.

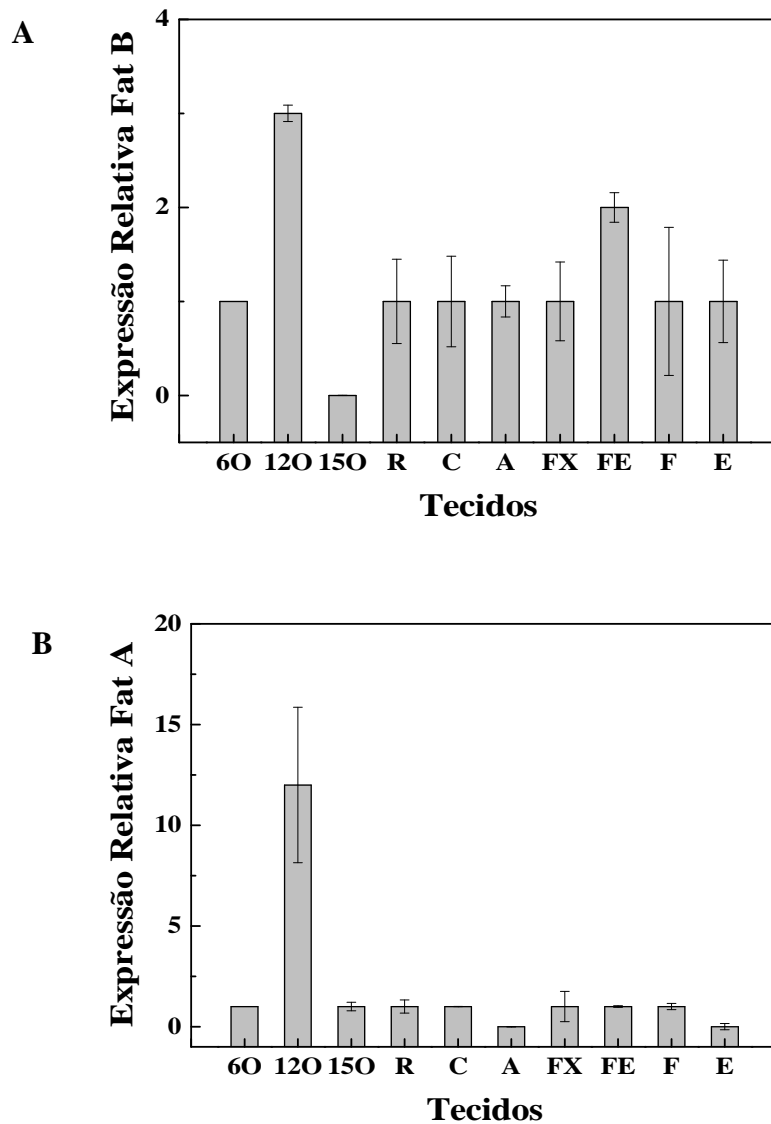


Figura 5.16 – Expressão relativa das tioesterases em relação aos genes-referência proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil B e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, analisados nos tecidos de *Theobroma cacao* nos estágios de desenvolvimento em 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 dias após a polinização (DAP), empregando como normalizador, embriões de 60 DAP. Eixo X: Embrião de 60 DAP (6O), embrião de 120 DAP (12O), embrião de 150 DAP (15O), raiz (R), caule (C), ápice vegetativo (A), folha expandida (FX), folha em expansão (FE), flor (F) e epicarpo (E). Eixo Y: valores relativos de expressão correspondentes. Em A: expressão relativa da acil-ACP tioesterase B (Fat B). Em B: expressão relativa da isoforma acil-ACP tioesterase A (Fat A)

### 5.8.5 Expressão das acil-CoA sintetase A e B (ACS A e ACS B) nos diversos tecidos de *Theobroma cacao*

As enzimas acil-CoA sintetase mostraram maior expressão em folhas em expansão e flor com valores de expressão de  $15,1 \pm 14,0$  e  $11,6 \pm 10,6$ , mas o intervalo de confiança não permitiu considerá-las significativas (Figura 5.17). A expressão do embrião de 120 DAP foi  $7,2 \pm 0,4$ , sendo significativamente maior em relação aos demais tecidos (folha expandida ( $3,2 \pm 3,2$ ), caule ( $3,3 \pm 3,3$ ), raiz ( $1,6 \pm 1,6$ ), ápice vegetativo ( $1,5 \pm 1,5$ ), epicarpo ( $1,2 \pm 1,1$ ) e embrião de 150 DAP ( $1,4 \pm 0,9$ )) (Figura 5.17).

O gene da acil-CoA sintetase B mostrou maior expressão nos embriões em 120 e 150 DAP (Figura 5.15). Em folha em expansão, o valor de expressão foi  $17,9 \pm 16,5$ ; mas intervalo de confiança não permitiu considerá-la significativa perante os demais tecidos (Figura 5.15). Houve expressão significativamente superior em raiz ( $17,2 \pm 5,9$ ) em relação à folha expandida ( $0,4 \pm 0,1$ ), flor ( $0,7 \pm 0,1$ ), ápice vegetativo ( $0,9 \pm 0,5$ ), caule ( $4,0 \pm 1,5$ ) e epicarpo ( $3,0 \pm 0,2$ ), podendo-se sugerir maior especificidade para embriões.

Chong et al. (2008) investigaram a expressão de duas isoformas de acil-CoA sintetase (*BnLACS* e *AtLACS4*) em raiz, caule, folhas e flores de *Brassica napus*. O gene *BnLACS4* foi altamente expresso em raiz e flores e fracamente expresso em caule e folhas e *AtLACS4* foi expresso em raiz, folhas e flores, e não no caule.

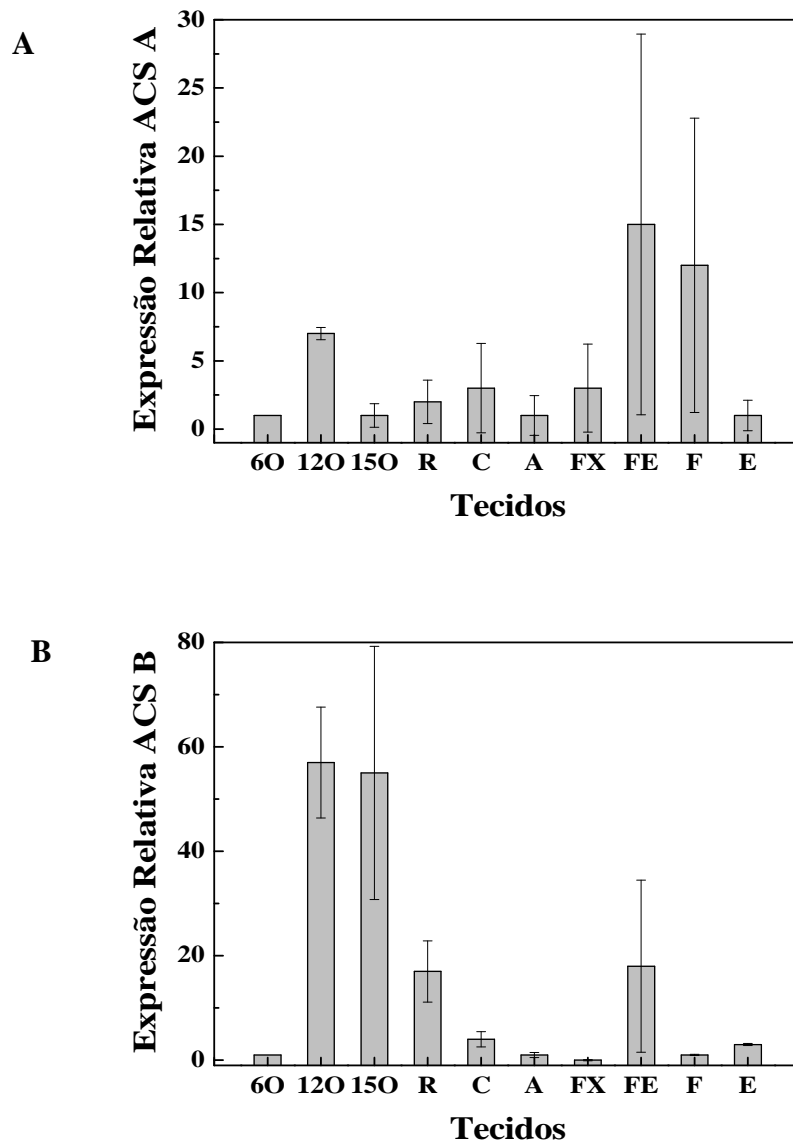


Figura 5.17 – Expressão relativa das isoformas de acil-CoA sintetase em relação aos genes-referência proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil B e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, analisados nos tecidos de *Theobroma cacao* nos estágios de desenvolvimento em 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 dias após a polinização (DAP), empregando como normalizador, embriões de 60 DAP. Eixo X: Embrião de 60 DAP (60), embrião de 120 DAP (120), embrião de 150 DAP (150), raiz (R), caule (C), ápice vegetativo (A), folha expandida (FX), folha em expansão (FE), flor (F) e epicarpo (E). Eixo Y: valores relativos de expressão correspondentes. Em A: expressão relativa da acil-CoA sintetase A (ACS A). Em B: expressão relativa da isoforma acil-CoA sintetase B (ACS B).



### 5.8.6 Expressão da oleosina nos embriões de *Theobroma cacao*

A expressão dos transcritos de oleosina demonstraram ser embrião-específicos ou preferencial. O transcrito da oleosina avaliado mostrou expressão significativa nas sementes de 120 e 150 DAP ( $9173,32 \pm 8295,87$  e  $750,05 \pm 598,15$ ). Nos demais tecidos a expressão foi baixa comparada aos embriões (folha expandida ( $7,83 \pm 7,65$ ); flor ( $9,97 \pm 9,51$ ); caule ( $1,37 \pm 0,82$ ) e raiz, ( $1,26 \pm 0,41$ )), ou mostrou-se reprimida (folha em expansão ( $0,6 \pm 0,21$ ); ápice vegetativo ( $0,67 \pm 0,45$ ) e epicarpo ( $0,79 \pm 0,4$ ); (Figura 5.18).

Simkin et al. (2006), analisaram os níveis de expressão de isoformas de oleosinas em raiz, folha jovem, caule, flor e frutos em diversos estágios de desenvolvimento de café. A oleosina foi fortemente expressa durante o desenvolvimento das sementes, mas nos tecidos restantes foi muito baixa ou nula, corroborando os dados obtidos no presente trabalho.

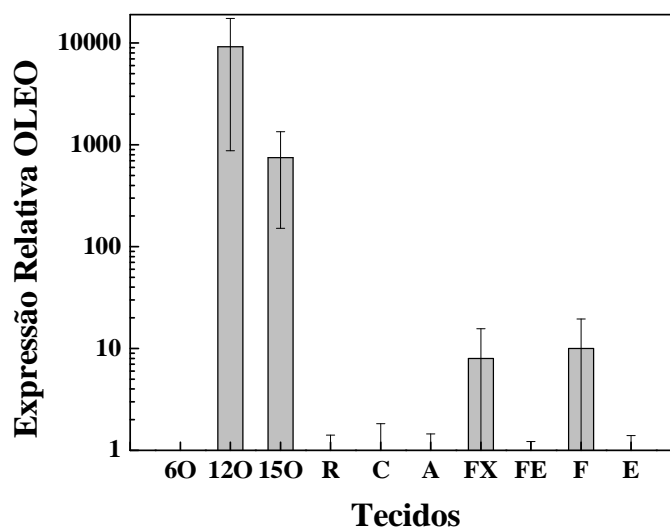


Figura 5.18 – Expressão relativa da oleosina em relação aos genes-referência proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil B e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, analisados nos tecidos de *Theobroma cacao* nos estágios de desenvolvimento em 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 dias após a polinização (DAP), empregando como normalizador, embriões de 60 DAP. Eixo X: Embrião de 60 DAP (6O), embrião de 120 DAP (12O), embrião de 150 DAP (15O), raiz (R), caule (C), ápice vegetativo (A), folha expandida (FX), folha em expansão (FE), flor (F) e epicarpo (E). Eixo Y: valores relativos de expressão correspondentes

### **5.9 Correlação entre acúmulo de transcritos e composição de ácido graxos das sementes em desenvolvimento**

Com o objetivo de se estabelecer relações entre variações na expressão dos genes da via metabólica de ácidos graxos durante o desenvolvimento dos embriões de *Theobroma cacao* e a composição molar de ácidos graxos dos embriões no mesmo período, foram calculados o coeficiente de correlação entre essas variáveis (Tabela 5.11). De modo geral, o percentual molar de palmitato foi altamente correlacionada ao valor relativo de transcritos da proteína carregadora de acil C (0,633) e oleosina (0,660). A concentração de estearato foi altamente correlacionada com acúmulo de transcritos de acil- CoA sintetase B (0,720), enquanto que o de oleato foi altamente correlacionado com a expressão relativa de acil- CoA sintetase B (0,708). O ácido linoleico mostrou-se negativamente correlacionado com acil-CoA sintetase B (-0,743), e o padrão de acumulação do ácido linolênico (C18:3) mostrou-se altamente correlacionados ao acúmulo de transcritos de  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II (0,700) e negativamente correlacionado a acil- CoA sintetase B (-0,685). O ácido gadoleico foi altamente correlacionado ao acúmulo d transcritos de acil-ACP tioesterase A (0,776).

Tabela 5.11 - Coeficientes de correlação para os padrões de expressão gênica relativa e os padrões de acumulação de lipídeos. Os valores em negrito e sublinhados mostram significância estatística (nível de probabilidade 1%) e os valores apenas sublinhados mostram que o valor da correlação é significativo (nível de probabilidade 5%)

	<b>16:0-</b> <b>Palmitato</b>	<b>18:0-</b> <b>Estearato</b>	<b>18:1-</b> <b>Oleato</b>	<b>18:2-</b> <b>Linolato</b>	<b>18:3-</b> <b>Linolênato</b>	<b>20:1-</b> <b>Gadolato</b>
<b>ACP A</b>	-0,490	-0,119	-0,263	0,160	0,156	-0,527
<b>ACP B</b>	-0,413	-0,144	-0,2180	0,138	0,137	-0,345
<b>ACP C</b>	<b><u>0,633</u></b>	-0,186	-0,006	0,097	0,240	-0,383
<b>KAS II</b>	0,401	-0,564	-0,596	0,556	<b><u>0,700</u></b>	0,341
<b>SAD A</b>	-0,244	-0,151	-0,180	0,101	0,109	-0,06
<b>SAD B</b>	-0,186	0,208	0,140	-0,245	-0,202	0,189
<b>FAT B</b>	0,195	-0,191	-0,188	0,110	0,173	0,646
<b>FAT A</b>	0,580	-0,001	0,089	-0,11	0,002	<b><u>0,776</u></b>
<b>ACS A</b>	0,583	-0,140	-0,115	0,102	0,263	0,585
<b>ACS B</b>	-0,044	<b><u>0,720</u></b>	<b><u>0,708</u></b>	<b><u>-0,743</u></b>	<b><u>-0,685</u></b>	0,201
<b>Oleosina</b>	<b><u>0,660</u></b>	0,169	0,274	-0,271	-0,137	0,749

O substrato 16:0-ACP representa o primeiro maior ponto de ramificação da via de biossíntese de ácidos graxos por ser utilizado por duas das principais enzimas envolvidas:  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II e acil-ACP tioesterase B. No caso de 16:0-ACP ser elongado a 18:0-ACP, que então será o substrato da estearoil-ACP desaturase (CAHOON; SHANKLIN, 2000) após a insaturação, poderá ser substrato da acil-ACP tioesterase A. A razão entre a quantidade de transcritos primários dessas enzimas sugere o substrato líquido para ação da próxima enzima. O coeficiente de correlação foi então calculado entre a razão entre a quantidade de transcritos das enzimas atuantes no primeiro e segundo ponto importantes de bifurcação da via de biossíntese de ácidos graxos, com o objetivo de calcular a significância entre estas (Tabela 5.12).

Tabela 5.12: Coeficientes de correlação entre razão dos padrões de expressão gênica e os padrões de acumulação de lipídeos. Os valores em negrito e sublinhados mostram alta significância (nível de probabilidade 1%) e os valores apenas sublinhados mostram que o valor da correlação é significativo (nível de probabilidade 5%).

	<b>16:0- Palmítico</b>	<b>18:0- Esteárico</b>	<b>18:1- Oleico</b>	<b>18:2- Linoleico</b>	<b>18:3- Linolênic o</b>	<b>20:1- Gadoleico</b>
<b>KASII/SADA</b>	0,554	<b><u>-0,633</u></b>	<b><u>-0,652</u></b>	<b><u>0,656</u></b>	<u>0,784</u>	0,340
<b>KASII/SADB</b>	0,507	<u>-0,740</u>	<u>-0,759</u>	<u>0,770</u>	<u>0,869</u>	0,126
<b>FATA/SADA</b>	<b><u>0,705</u></b>	-0,042	0,050	-0,051	0,073	<b><u>0,843</u></b>
<b>FATA/SADB</b>	<u>0,773</u>	-0,192	-0,066	0,087	0,208	<b><u>0,822</u></b>
<b>FATB/SADA</b>	0,497	-0,143	-0,128	0,0970	0,169	0,597
<b>FATB/SADB</b>	0,479	-0,435	-0,393	0,383	0,419	0,521
<b>KASII/FATA</b>	0,116	<u>-0,764</u>	<b><u>-0,710</u></b>	<u>0,789</u>	<b><u>0,719</u></b>	<u>-0,890</u>
<b>KASII/FATB</b>	0,335	<b><u>-0,652</u></b>	<b><u>-0,698</u></b>	<b><u>0,715</u></b>	<u>0,800</u>	-0,668

A concentração de ácido palmítico foi altamente correlacionado com a razão entre transcritos de acil-ACP tioesterase A/  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase A (0,705) e acil-ACP tioesterase A/ $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase B (0,773). Já os valores de ácido esteárico mostraram-se negativamente correlacionados a razão entre  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/ $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase A (-0,633) e  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/acil-ACP tioesterase B (0,773),  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase B (-0,764) e  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/acil-ACP tioesterase A (-0,652). Analisando as possíveis correlações entre a concentração de ácido oleico, esta foi altamente negativa entre  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/ $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase A (-0,652), entre  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/acil-ACP tioesterase A (-0,710), entre  $\beta$ -cetoacil-

ACP sintase II/acil-ACP tioesterase B (-0,698), entre  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase B(-0,759). O ácido linoleico foi altamente correlacionado com as razões entre a expressão relativa dos genes da  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase A (0,656),  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/acil-ACP tioesterase B (0,715),  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase B (0,770) e  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/acil-ACP tioesterase A (0,790). O ácido linolênico mostrou-se altamente correlacionado a razão de expressão relativa dos transcritos de  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/acil-ACP tioesterase A (0,719),  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase A (0,784),  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/ $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase B (0,8690) e  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/acil-ACP tioesterase B (0,800). O ácido gadoleico mostrou-se altamente correlacionado a acil-ACP tioesterase A/  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase A (0,843), acil-ACP tioesterase A/  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase B (0,822) e negativamente altamente correlacionado com  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/acil-ACP tioesterase A (-0,890).

A razão entre o número de transcritos das enzimas e a porcentagem de ácidos graxos mostraram maior nível de correlação, por exemplo, quando se compara a correlação dos genes e ácido esteárico. Quando analisado individualmente, apenas um gene, o acil- CoA sintetase B mostrou ser significativo, contra quatro relações de genes:  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/ $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase A,  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/ acil-ACP tioesterase A e  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/ acil-ACP tioesterase B,  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II/  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase B.

De acordo com a análise do perfil de ácidos graxos, com o aumento de ácido esteárico a partir de 110 DAP seria esperado correlações positivas entre as enzimas participantes desta síntese. Entretanto, as correlações ou não se mostraram significantes, ou mostraram-se negativas. Esse resultado pode ser justificado pelo método de quantificação usado, ou seja, a quantidade de transcritos está expressa em quantidade relativa em relação ao calibrador 60 DAP e não em um número absoluto de cópias como seria na quantificação absoluta. Desta maneira, não possuindo um valor exato do número de cópias de transcritos das enzimas envolvidas na biossíntese de ácidos esteárico, não foi possível a visualização do resultado esperado.

## 5.10 Biossíntese de ácidos graxos

As proteínas carregadoras de acil apresentaram expressão mais constantes, e a maior quantidade de transcritos (proteína carregadora de acil C) do complexo Sintase de Ácidos Graxos (FAS) no desenvolvimento das sementes de *Theobroma cacao*. Isso é justificado, pois quase todos os ácidos graxos encontrados nas membranas lipídicas ou como estoque nas sementes, são sintetizados com a participação desta proteína (SCHMID; OHLROGGE, 2002). Entre os genes investigados, não houve nenhum com característica de ser preferencialmente nos embriões. Portanto, o padrão de expressão desses genes ACP pareceu estar associado a síntese contínua de ácidos graxos, conforme esperado.

A enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II, que alonga o substrato 16:0-ACP até 18:0-ACP, é a principal responsável por sintetizar ácido esteárico. O gene analisado que codifica esta enzima mostrou pico de expressão aos 100 DAP, com queda gradativa de acumulação de transcritos até o final do desenvolvimento das sementes. Esse período coincide com o padrão de acúmulo de transcritos da acil-ACP tioesterase B (desconsiderando a amostra referente a 80 DAP, a qual apresentou problemas na análise da expressão), e com o início do acúmulo de estearato nos embriões. Esse transcrito também demonstrou ser preferencialmente expresso em embriões de cacaueteiro em relação aos outros tecidos avaliados. O padrão de expressão desse gene sugere um papel importante no alto acúmulo de estearato nas sementes de cacaueteiro

Por outro lado, os transcritos das enzimas  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase A e B mostraram maior acumulação entre 90 e 140 DAP com pico aos 110-120 DAP durante o desenvolvimento das sementes. O período de maior expressão das desaturases (principalmente  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase B) coincidiu com o rápido aumento do ácido esteárico (100 a 110 DAP), e portanto, ocorreu após o pico de transcrição da  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II.

Os transcritos das acil-ACP tioesterase (A e B) demonstraram ser preferencialmente expressos em embriões. Os transcritos da enzima acil-ACP tioesterase A mostrou padrão de expressão crescente desde o início do desenvolvimento do fruto, com pico de expressão aos 110 DAP. Após esse período, os valores de expressão mostraram-se decrescentes até a maturação. Esse padrão de expressão coincidiu com o período de intenso metabolismo de lipídeos e de rápido acúmulo de estearato e oleato. Porém, o pico de expressão foi posterior ao da  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II e coincidente com a  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase B, sugerindo que

o balanço de transcrição entre esses genes poderia estar definindo a composição de ácidos graxos dos embriões de cacaueteiro.

As isoformas acil-CoA sintetase A e acil-CoA sintetase B mostraram se expressar de forma temporal e quantitativa distinta, sendo que os transcritos da acil-CoA sintetase B serem preferencialmente expressos em embriões. O maior índice de expressão da acil-CoA sintetase A aconteceu no período de intensa síntese de lipídeos. Já a enzima acil-CoA sintetase B expressou-se mais no fim do desenvolvimento das sementes. Como a síntese de triglicerídeos é contínua e com diminuição de seu fluxo no fim do desenvolvimento, sugere-se que ambas isoformas são essenciais na via metabólica.

Da mesma forma, transcritos de oleosina foram os mais embriões-específicos e apresentaram acúmulo elevado nos estágios finais de desenvolvimento dos embriões (a partir de 90 dias), quando ocorre o início do acúmulo de lipídeos de armazenamento.

### **5.11 Acumulação de ácido esteárico em *Theobroma cacao***

Durante o desenvolvimento dos embriões de *Theobroma cacao*, a composição de ácido palmítico mostrou-se constante, enquanto que o ácido oleico e ácido esteárico aumentaram significativamente entre 100 e 110 DAP. A porcentagem dos ácidos graxos poliinsaturados (18:2 e 18:3) foi inversamente proporcional, pois diminuiu a partir dos 110 DAP, indicando uma alteração de biossíntese de óleos com composição mais próxima a lipídeos de membranas do que lipídeos de armazenamento. Os transcritos do gene diretamente associado à síntese de palmitato (acil-ACP tioesterase B), demonstrou menor valor de acúmulo e constância durante todo o período de desenvolvimento dos frutos. As enzimas diretamente relacionadas à síntese e/ou acúmulo de ácido esteárico são a  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II, a  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase B e a enzima, a qual possui especificidade pelo substrato 18:1-ACP, mas uma menor atividade em 18:0-ACP e 16:0-ACP (FACCIOTTI et al., 1999; OHLROGGE; JAWORSKI, 1997).

O período de aumento na quantidade de transcritos das enzimas  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II, acil-ACP tioesterase A, acil-ACP tioesterase B e da quantidade de ácido esteárico é também concomitante ao aumento da expressão do gene codificador da  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase B, e do aumento da quantidade de ácido oleico e esteárico.

Patel (1993) estudando a expressão da  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase durante o desenvolvimento de embriões de *T. cacao*, observou maiores níveis de transcritos entre 95 e 105 DAP. A autora concluiu que a diminuição nos ácidos graxos insaturados e aumento de 18:0 pode ocorrer mesmo com intensa produção de  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase. Duas hipóteses são consideradas, sendo que ou a  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase pode não conseguir insaturar todos os substratos estearoil-ACP, ou a acil-ACP tioesterase B hidrolisa rapidamente os estearoil-ACP; não fornecendo substrato para a ação das desaturases.

Com os dados obtidos no presente estudo, sugere-se que a acumulação de transcritos da  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase foi relacionada ao aumento do ácido oleico que acontece pela ação conjunta da  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase,  $\Delta^{12}$ oleatoil-ACP desaturase e acil-ACP tioesterase A.

Os resultados deste trabalho sugerem um mecanismo de acumulação de ácido esteárico, pela análise temporal da expressão dos genes codificadores das enzimas  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II, acil-ACP tioesterase A, acil-ACP tioesterase B. A expressão da  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II apresentou pico aos 100 DAP e a acil-ACP tioesterase A teve pico de expressão aos 110 DAP, mas aos 100 DAP mostrou-se fortemente expressa. A acil-ACP tioesterase B mostrou menor quantidade de transcritos com tendência de aumento de 100 aos 130DAP. O período de maior acumulação de transcritos destas enzimas coincidem com o aumento do ácido esteárico, o qual aos 100 DAP apresentava-se em 3,2% e aos 110 DAP chegou a 26,3 e em 120 DAP 37,0%. Desta maneira, a enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II aos 100 DAP possivelmente fornece o máximo de substratos 18:0-ACP, que é hidrolizado pela enzima acil-ACP tioesterase A, que mesmo tendo preferência pelo substrato 18:1, age hidrolisando estearóil-ACP, sendo compensada por apresentar maior quantidade de transcritos.

Silva et al. (2005) estudando a expressão gênica das principais enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos em *Theobroma cacao*, com a técnica de *northern blot* estabeleceu um modelo para a acumulação de ácido esteárico em sementes de cacau. Considerou que a expressão contínua e crescente de  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II fornece o substrato 18:0-ACP, e assumindo-se que a expressão da  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase (medida anteriormente por *western blot* por Patel, 1993) diminui por volta de 115–120 DAP, juntamente com a acil-ACP tioesterase A; ocorre um desbalanceamento entre a expressão dos genes codificadores destas enzimas, garantindo o acúmulo de estearato. Comparando os resultados de Silva (2005) com os do presente trabalho, assume-se que o modelo de acumulação de ácidos esteárico foi confirmado, considerando-se que o padrão de expressão entre os dois estudos foi semelhante.



## 6. CONCLUSÕES

De forma a identificar genes de referência para estudos de expressão gênica em *Theobroma cacao*, foram investigados os valores de estabilidade dos genes codificadores das enzimas/proteínas gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), proteína ribossomal L35 (RPL35), actina (ACT), beta tubulina 5 (TUB5), malato desidrogenase (MDH), fator de alongação 1-alfa (EF1 $\alpha$ ) e poliubiquitina (PUB) nos embriões de *Theobroma cacao* em desenvolvimento e em sete outros tecidos: raiz, caule, ápice vegetativo, folha expandida, folha em expansão, flor e epicarpo. Por meio de análise empregando os *softwares* *GeNorm* e *NormFinder*, os três genes mais estáveis para análises de expressão gênica em embriões de *T. cacao* foram os codificadores da proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil A e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. Quando se considera diversos tecidos de *Theobroma cacao*, os três melhores genes para se normalizar os valores de expressão são os codificadores da proteína ribossomal L35, proteína carregadora de acil B e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

De acordo com as funções fundamentais exercidas na biossíntese de ácidos graxos e principalmente de ácidos esteárico, foram estudados os níveis de acumulação de transcritos dos principais genes desta via metabólica: três isoformas da proteína carregadora de acil (ACP A, ACP B e ACP C),  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II (KAS II), duas isoformas da  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase (SAD A e SAD B), Acil-ACP tioesterase A (Fat A), Acil-ACP tioesterase B (Fat B), duas isoformas da acil-CoA sintetase (ACS A e ACS B) e a proteína oleosina (OLEO). A expressão destes genes foi medida em embriões nos estágios de desenvolvimento referentes a 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 DAP. Raiz, caule, ápice vegetativo, folhas expandidas, folhas em expansão, flor e epicarpo foram usados para certificar a ação tecido-específica dos genes estudados. Desta maneira, concluiu-se que em geral, os genes pertencentes ao metabolismo de lipídeos, analisados nos embriões de *Theobroma cacao* mostraram expressão em todas as amostras. Já os mesmos genes quando medidas as expressões nos demais tecidos, mostraram menores quantidades de transcritos, com expressões baixas ou nulas na maioria das amostras. Os genes codificadores da proteína carregadora de acil A, B e C expressaram-se de forma homogênea em todos os tecidos, pois trata-se de uma proteína indispensável na biossíntese de ácidos graxos. A expressão dos genes codificadores das enzimas  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II,  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase B, acil-ACP tioesterases B, acil-ACP tioesterases A, acil-CoA sintetase B e oleosina mostraram-se

preferencial ou específica em embriões de *Theobroma cacao*. Já os genes  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase A e acil-CoA sintetase B, mostraram expressão em embriões, mas também em outros tecidos.

A acumulação de transcritos da  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase foi relacionada ao aumento de ácido oleico e que acontece pela ação conjunta da  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase, e acil-ACP tioesterase A, a qual mostra maiores níveis de transcritos entre 90 e 140 DAP com pico aos 100 DAP.

O aumento de ácidos esteárico estaria relacionado com a ação conjunta e com transcrição temporalmente coordenada dos genes das enzimas  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II, Acil-ACP tioesterase A e Acil-ACP tioesterase B. Transcritos da enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II apresentam pico aos 100 DAP, possivelmente com acúmulo máximo de substratos 18:0-ACP, que podem ser hidrolizados preferencialmente pela enzima acil-ACP tioesterase A, ou acil-ACP tioesterase B. Esse resultado corrobora o modelo de acumulação de estearato criado por Silva (2005).

## 7. REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A. K.; GARG, A. Congenital generalized lipodystrophy: significance of triglyceride biosynthetic pathways. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 14, p. 214–221, 2003.
- AGRIANUAL. FNP Consultoria e Comércio. **Mercado e perspectivas: cacau**. São Paulo: Agroinformática, 2009.
- AGRIANUAL. FNP Consultoria e Comércio. **Mercado e perspectivas: cacau**. São Paulo: Agroinformática, 2008.
- ALURU, M. R. et al. Differential expression of fatty acid synthase genes, *Acl*, *Fat* and *Kas*, in *Capsicum* fruit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 1655–1664, 2003.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Chicago, v. 64, p. 5245–5250, 2004.
- ARGOUT, X. et al. Towards the understanding of the cocoa transcriptome: Production and analysis of an exhaustive dataset of ESTs of *Theobroma cacao* generated from various tissues and under various conditions. **BMC Genomics**, London, v. 9, p. 1-45, 2008.
- BAERSON, S. R.; LAMPPA, G. K. Developmental regulation of an acyl carrier protein gene promoter in vegetative and reproductive tissues. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 22, p. 255–267, 1993.
- BATTEY, J. F.; OHLROGGE, J. B. Evolutionary and tissue-specific control of expression of multiple acyl-carrier protein isoforms in plants and bacteria. **Planta**, Berlin, v. 180, p. 352-360, 1990.
- BAYER C. et al. Support for an expanded family concept of Malvaceae within a recircumscribed order Malvales: a combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* DNA sequences. **Botanical journal of the Linnean Society**, London, v. 129, p. 267–303, 1999.
- BERBERT, P. R. F. Influência das condições climáticas na composição química e características físicas da manteiga do cacau. **Revista Theobroma**, Itabuna, v. 6, n. 3, p. 67-76, 1976.
- BERBERT, P. R. F.; ALVIM, P. T. Fatores que afetam o índice de iodo da manteiga de cacau do Brasil. **Revista Theobroma**, Itabuna, v. 2, n. 1, p. 3-16, 1972.
- BHATIA, P. et al. Comparison of lyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 216, p. 223–226, 1994.

BIRBOIM, H. C.; DOLY, J. A. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmids. **Nucleic Acid Research**, London, v. 7, p. 1513-1523, 1979.

BONAVENTURE, G.; OHLROGGE, J. B. Differential regulation of mRNA levels of acyl carrier protein isoforms in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 128, p. 223–235, 2002.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, Natick, v. 36, p. 214-216, 2004.

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

BYERS, D. M.; GONG H. Acyl carrier protein: structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 85, p. 649–662, 2007.

BYFIELD, G. E., XUE, H.; UPCHURCH, R. G. Two genes from soybean encoding soluble  $\Delta^9$  stearoyl-ACP desaturases. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 840–846, 2006.

BYFIELD, G. E.; UPCHURCH, R.G. Effect of temperature on delta-9 stearoyl-ACP and microsomal omega-6 desaturase gene expression and fatty acid content in developing soybean seeds. **Crop Science**, Madison, v. 47, p. 1698–1704, 2007.

CAHOON, E. B. et al. cDNAs for isoforms of the delta 9-stearoyl-acyl carrier protein desaturase from *Thunbergia alata* endosperm. **Plant Physiology**, Rockville, v. 106, p. 807-808, 1994.

CAHOON, E. B.; SHANKLIN, J. Substrate-dependent mutant complementation to select fatty acid desaturase variants for metabolic engineering of plant seed oils. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 97, p. 12350-12355, 2000.

CARPENTER, D. R. et al. Lipid composition of *Herrania* and *Theobroma* seeds. **Journal of American Oil Chemistry Society**, Champaign, v. 71, p. 845-851, 1994.

CHEN, G. Q. Expression profiles of genes involved in fatty acid and triacylglycerol synthesis in castor bean (*Ricinus communis* L.). **Lipids**, Chicago, v. 42, n. 3, p. 263-274, 2007.

CHOI, J. K. et al. Phorbol esters selectively and reversibly inhibit a subset of myofibrillar genes responsible for the ongoing differentiation program of chick skeletal myotubes. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 11, p. 4473–4482, 1991.

CHONG, B. et al. In silicon cloning and analysis of a LACS Gene in *Brassica napus*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOINFORMATICS AND BIOMEDICAL ENGINEERING - ICBBE, 2., 2008, Shanghai. **Proceedings...** New York: IEEE, 2008. p. 140-143.

CRUZ, F. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 23, n. 4, p. 607-616, 2009.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions from the United States National Herbarium**, Washington, v. 35, p. 379-614, 1964.

CZECHOWSKI, T. et al. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 139, p. 5–17, 2005.

DIMICK, H. F. K. Principles of cocoa butter crystallization. **The Manufacturing Confectioner**. Glen rock, v. 71, n. 5, p. 109-14, 1991.

DITTMAR, H. F. K.; DUARTE, J. H. Cocoa fat from Bahia: I. Industrial cocoa butter. **Anais da Associação Brasileira de Química**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 93-101, 1960.

DONSON, J. et al. Comprehensive gene expression analysis by transcripting profiling. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 48, p. 75-97, 2002.

DORMANN, P.; VOELKER, T. A.; OHLROGGE, J. B. Accumulation of Palmitate in *Arabidopsis* Mediated by the Acyl-Acyl Carrier Protein Thioesterase FATB1. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, p. 637-644, 2000.

DORMANN, P.; VOELKER, T.; OHLROGGE, J. B. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a novel thioesterase from *Arabidopsis thaliana* specific for long-chain acyl-acyl carrier proteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 316, p. 612–618, 1995.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Boston, v. 12, p. 13-15, 1990.

ECCLESTON, V. S.; OHLROGGE, J. B. Expression of lauroylacyl carrier protein thioesterase in *Brassica napus* seeds induces pathways for both fatty acid oxidation and biosynthesis and implies a set point for triacylglycerol accumulation. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p. 613–622, 1998.

FACCIOTTI, M.T.; BERTAIN, P.B.; YUAN, L. Improved stearate phenotype in transgenic canola expressing a modified acyl-acyl carrier protein thioesterase. **Nature Biotechnology**, New York, v.17, p.593-597, 1999.

FIGUEIRA, A. et al. Cocoa butter quality can be improved by genetic breeding for fatty acid and triacylglycerol composition and hardness. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12., 1996, Salvador. **Proceedings...** Lagos, Nigeria: Cocoa Producers' Alliance, 2000. p. 399-407.

FINNEGAN, M. C. et al. Investigation of the expression of housekeeping genes in non-Hodgkin's lymphoma. **Leukemia and Lymphoma**, Chur, v. 10, p. 387–393, 1993.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 402, p. 1445–1454, 2004.

GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Lipids. In: \_\_\_\_\_. **Biochemistry**. 2. ed. Fort Worth: Saunders College, 1999. cap. 8, p. 238-258.

GILABERT-ESCRIVÁ, M. V. et al. Fatty acid and triacylglycerol composition and thermal behaviour of fats from seeds of Brazilian Amazonian *Theobroma* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 82, p. 1425-1431, 2002.

GIMENO, R. E.; CAO, J. Thematic review series: glycerolipids. Mammalian glycerol-3-phosphate acyltransferases: new genes for an old activity. **Journal of Lipid Research**, Memphis, v. 49, p. 2079–2088, 2008.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, Copenhagen, v. 30, n. 6, p. 503-512 2002.

GONZALEZ-BARO', M. R.; LEWIN, T. M.; COLEMAN, R. A. Regulation of Triglyceride Metabolism II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 292, p. G1195–G1199, 2007.

GRIFFITHS, G.; WALSH, M. C.; HARWOOD, J. L. Acyl-thioesterase activity in developing seeds of cocoa. **Phytochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1403-1405, 1993.

GRIFFITHS, G.; HARWOOD, J. L. The regulation of triacylglycerol biosynthesis in cocoa (*Theobroma cacao*) L. **Planta**, Berlin, v. 184, p. 279–284, 1991.

GUILLOTEAU, M. et al. Oil bodies in *Theobroma cacao* seeds: cloning and characterization of cDNA encoding the 15.8 and 16.9 kDa oleosins. **Plant Science**, Amsterdam, v. 164, n. 4, p. 597–606, 2003.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; PADLEY, F. B. **The lipid handbook**. 3. ed. London: Chapman and Hall, 1994.

HAKOZAKI, H. et al. Expression and developmental function of the *3-ketoacyl-ACP synthase2* gene in *Arabidopsis thaliana*. **Genes & Genetic Systems**, Mishima, v. 83, p. 143-152, 2008.

HARWOOD, J.L. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1301, p. 7-56, 1996.

HAWKINS, D. J.; KRIDL, J. C. Characterization of acyl-ACP thioesterases of mangosteen (*Garcinia mangostana*) seed and high levels of stearate production in transgenic canola. **The Plant Journal**, Oxford, v. 13, n. 6, p. 743-752, 1998.

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, New York, v. 11, p. 1026-1030, 1993.

HLOUSEK-RADOJCIC, A.; POST-BEITTENMILLER, D.; OHLROGGE, J. B. Expression of constitutive and tissue-specific acyl carrier protein isoforms in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, p. 206-214, 1992.

HONG, S. Y. et al. Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. **BMC Plant Biology**, London, v. 8, p. 112, 2008.

HUANG, A. H. C. Oilbodies and oleosins in seeds. **Annual Review Plant Physiology, Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 177–200, 1992.

HUANG, A. H. Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. **Plant Physiology**, Rockville, v. 110, p. 1055–1061, 1996.

JOLIVET, P. et al. Palmitoyl-Acyl Carrier Protein (ACP) Thioesterase and the Evolutionary Origin of Plant Acyl-ACP Thioesterases. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 7, n. 3, p. 359-371, 1995.

JOLIVET, P. Protein composition of oil bodies in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. **Plant Physiology Biochemistry**, Paris, v. 42, p. 501–509, 2004.

JONES, P.G. et al. Gene discovery and microarray analysis of *cacao* (*Theobroma cacao* L.) varieties. **Planta**, Berlin, v.216, p.255-264, 2002.

KENNEDY, E. Metabolism of lipides. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 26, p. 119–148. 1957.

KENNETH, J.; THOMAS, D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. **Methods**, San Diego, v. 25, p. 402–408, 2001.

KNUTZON, D. S. et al. Isolation and characterization of two safflower oleoyl-acyl carrier protein thioesterase cDNA clones. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, p. 1751-1758, 1992.

LEHRMAN, D. W.; KEENEY, P. G. Changes in lipid components of seeds during growth and ripening of *cacao* fruit. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 57, p. 61-65, 1980.

LIN, L. J. et al. Steroleosin, a sterol-binding dehydrogenase in seed oil bodies. **Plant Physiology**, Rockville, v. 128, p. 1200–1211, 2002.

LIU, K.; CHANG, H.; LIU, K. Enzymatic synthesis of cocoa butter analog through interesterification of lard and tristearin in supercritical carbon dioxide by lipase. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, p. 1303-1311, 2007.

LØVDAL, T.; LILLO, C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. **Analytical Biochemistry**, New York, n. 387, p. 238-242, 2009.

MANDAL, S. et al. Correlation studies on oil content and fatty acid profile of some Cruciferous species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 49, p. 551–556, 2002.

MCGINNIS, S.; MADDEN, T. L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. **Nucleic Acids Research**, London, v. 32, p. W20-W25, 2004.

MEKHEDOV, S.; ILÁRDUYA, O. M.; OHLROGGE, J. B. Toward a functional catalog of the plant genome. A survey of genes for lipid biosynthesis, **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 389–402, 2000.

MILLAR, A. A.; SMITH, M. A.; KUNST, L. All fatty acids are not equal: discrimination in plant membrane lipids. **Trends in Plant Science**, Killington, v. 5, n. 3, p. 95-101, 2000.

NAESTED, H. et al. Caleosins: Ca<sup>2+</sup>-binding proteins associated with lipid bodies. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 44, p. 463–476, 2000.

OHLROGGE, .B.; KUO, T. M. Control of lipid synthesis during soybean seed development: Enzymatic and immunochemical assay of acyl carrier protein. **Plant Physiology**, Rockville, v. 74, p. 622–625, 1984.

OHLROGGE, J. B.; KUO, T. M. Plants have isoforms for acyl carrier protein that are expressed differently in different tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 260, p. 8032-8037, 1985.

OHLROGGE, J. B.; JAWORSKI, J. G. Regulation of fatty acid synthesis. **Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 109-136, 1997.

PAOLACCI, A. R. et al. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. **BMC Molecular Biology**, London, v. 10, n. 11, p. 1-27, 2009.

PATEL, V. K.; SHANKLIN, J.; FURTEK, D. B. Changes in fatty-acid composition and stearoyl-acyl carrier protein desaturase expression in developing *Theobroma cacao* L. embryos. **Planta**, Berlin, v. 193, n. 1, p. 83-88, 1994.

PATEL, V. K. **Stearoyl-acyl carrier protein desaturase expression and changes in fatty acid composition in developing *Theobroma cacao* seeds**. 1993. Dissertation (M.Sc.) - Department of Food Science, Pennsylvania State University, University Park, 1993.

PEREGRIN-ALVAREZ, J. M. et al. PartiGeneDB–collating partial genomes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 33, p. D303–D307, 2005.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT– PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, p. 2002–2007, 2001.

PFAFFL, M. W.; HAGELEIT, M. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT–PCR. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 23, p. 275–282, 2001.

PIDKOWICH, M. S. et al. Modulating seed -ketoacyl-acyl carrier protein synthase II level converts the composition of a temperate seed oil to that of a palm-like tropical oil. **Plant Biology**, New York, v. 104, n. 11, p. 4742-4747, 2007.

PIRES, J. L. et al. Cacao germoplasm characterization base don fat content. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON COCOA BREEDING STRATEGIES, 1998, Kuala Lumpur, Malaysia. **Proceedings...** Kuala Lumpur: Genetics society of Malaysia, 1998.



POSORSKE, L. H. et al. Process considerations of continuous fat modification with an immobilized lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 65, p. 922, 1988.

PURSEGLOVE, J. W. Tropical crops-dicotyledons. **Longman Green London**, London v. 1, p. 332, 1968.

REMANS, T. et al. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. **Planta**, Berlin, v. 227, p. 1343–1349, 2008.

SCHMID, K. M.; OHLROGGE, J. B. Lipid metabolism in plants. In: VANCE, D.E.; VANCE, J.E. (Ed.). **Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2002. p. 93–126.

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of Biochemistry and Biophysical Methods**, Amsterdam, v. 46, p. 69–81, 2000.

SERELS, S. et al. Molecular studies of human connexin 43 (Cx43) expression in isolated corporal tissue strips and cultured corporal smooth muscle cells. **International Journal Impotence Research**, London, v. 10, p. 135–143, 1998.

SERENO, M. L. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 7, p. 13–24, 2006.

SHANKLIN, J.; SOMERVILLE, C. Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal, 1991. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 88, p. 2510–2514, 1991.

SHINTANI, D. K.; OHLROGGE, J. B. The characterization of a mitochondrial acyl carrier protein isoform isolated from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, p. 1221–1229, 1994.

SHOCKEY, J M.; FULDA, M. S.; BROWSE, J. *Arabidopsis* contains a large superfamily of acyl-activating enzymes. Phylogenetic and biochemical analysis reveals a new class of acyl-coenzyme A synthetases. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 1065–1076, 2003.

SILVA, C. R. S. **Filogenia do gênero *Theobroma* utilizando marcadores moleculares e bioquímicos**. 2000. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

SILVA, C. R. S. **Caracterização de seqüências gênicas expressas (EST) durante o desenvolvimento de sementes de *Theobroma cacao* L. com ênfase na biossíntese de ácidos graxos e triglicérides.** 2005. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

SILVA, C. R. S.; FIGUEIRA, A. V. O. Phylogenetic analysis of *Theobroma* (Sterculiaceae) base don Kunitz-like trypsin inhibitor sequences. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 250, p. 93-104, 2005.

SILVA, C. R. S.; FIGUEIRA, A.V.O.; SOUZA, C. A. S. Diversidade no gênero *Theobroma*. In: DIAS, L. A. S. (Org.). **Melhoramento genético do cacauero**. 1. ed. Goiânia: FUNAPE, v. 1, p. 49-80, 2001.

SIMKIN, A. J. Oleosin gene family of *Coffea canephora*: Quantitative expression analysis of five oleosin genes in developing and germinating coffee grain. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, p. 691-708, 2006.

SOMERVILLE, C.; BROWSE, J.; JAWORSKI, J. G.; OHLROGGE, J. B. Lipids. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologist, 2000. cap. 10, p. 456-527.

SOMERVILLE, C.; BROWSE, J. Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes. **Science**, Washington, v. 252, p. 80–87, 1991.

SONG, P.; ALLEN, R. D. Identification of a cotton fiber specific acyl carrier protein cDNA by differential display. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1351, p. 305–312, 1997.

SOONG, R.; RUSCHOFF, J.; TABITI, K. Detection of colorectal micrometastasis by quantitative RT-PCR of cytokeratin 20 mRNA. **Proceedings of the American Association for Cancer Research**, Baltimore, v. 41, p. 391, 2000.

SOUZA, C. A. S.; DIAS, L. A. S. Melhoramento ambiental e sócio-economia. In: DIAS, L. A. S. (Org.). **Melhoramento genético do cacauero**. 1. ed. Goiânia: FUNAPE, 2001. v.1, p. 1-47.

SUH, M. C.; SCHULTZ, D. J.; OHLROGGE, J. B. Isoforms of acyl carrier protein involved in seed-specific fatty acid synthesis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 17, p. 679–688, 1999.

THELLIN, O. et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 75, p. 291–295, 1999.

TZEN, J. T. C. et al. Oleosin isoforms of high and low molecular weights are present in the oilbodies of diverse seed species. **Plant Physiology**, Rockville, v. 94, p. 1282–1289, 1990.

TZEN, J. T. C. et al. Lipids, proteins, and structure of seed oilbodies from diverse species. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, p. 267–276, 1993.

TZEN, J. T. C.; HUANG, A. H. C. Surface-structure and properties of plant seed oil bodies. **Journal of Cell Biology**, London, v. 117, p. 327–335, 1992.

TZEN, J. T. et al. A new method for seed oil body purification and examination of oil body integrity following germination. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 121, p. 762–768, 1997.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, London, v. 3, n. 7, p. 34.1-34.12, 2002.

VERICA, J. A. et al. Isolation of ESTs from *cacao* (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. **Plant Cell Reports**, New York, v. 23, p. 404-413, 2004.

VOELKER, T. Plant acyl-ACP thioesterases: chain-length determining enzymes in plant fatty acid biosynthesis. **Genetic Engineering**, New York, v. 18, p. 111–133, 1996.

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

WEI, Q. et al. Expression of five selected human mismatch repair genes simultaneously detected in normal and cancer cell lines by a nonradioactive multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology**, Basel, v. 65, p. 293–300, 1997.

WORLD COCOA FOUNDATION. Disponível em: <<http://www.worldcocoafoundation.org>>. Acesso em: 17 abr. 2009.

YEN, C. E. et al. Thematic review series: Glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. **Journal of Lipid Research**, Memphis, v. 49, p. 2283-2301, 2008.

**APÊNCICES**

APÊNDICE A – Sequências usadas na construção dos iniciadores referentes aos genes codificadores da proteína carregadora de acil A (ACP A),  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II (KAS II), acil-ACP tioesterase tipo B (Fat B) e oleosina. Os iniciadores estão sublinhados e em negrito.

Sequência referente ao gene codificador da proteína carregadora de acil A

```
>BIEM-NT-001-018-D02-CE.F
CCACGCGTCCGCCAGGTTTCGACTCGAGTCGGAAACAGAAATGGCACTCATAGCAGCCGTACTTCGCCACATTTCGAGTACCTG
TTCGAACCCCTAGCTGCAACCCGATCAAACCTCAGCTGCAATGGAGTCTCTGCAATTCATCAGGTTATTTTCATCGGACGAC
GATCACCTAACGAAAGAGGAAAGTAATCGACAGAGTCCCTCGACGTGTCAAAGCTTCCCAAAGTCGATCCGTCCAAGGTGAC
ACCTCATGTCCATTTCCAAAACGATTTGGGCTTGGATAGCTTGGACAATGTGGAGATTGTAATGGCATTAGAAGAGGAGTTCA
AGCTGGAATTCAGACAAGGAAGCTGACAAGATTGACTCATGTAATCTCGCTATTGCGTACATATAAACCATCCAATGGCT
GGTTAATCTGTGGAAAGCAAGGGTGTCTCGTTGAATTTTCATCAAAAAGAAGAACGATGTCTTCTACTCTGTTTGGTGTTC
ATATTTTAGGTGTTTGTATCAAATTTACTCCTCATAATGAGATTAAGACTGACAATCTGAATCTGTNTTGGTGGGGTACTACC
TGAACCTGTNTCTAGCACAAAACAACAGCAGATTTCAACTCGCAATAAACTTTTGTATTGCATGGTGACTTTCTTCACCTTT
CAAGTACTTCTTTTACATTTGCCGTTGTCTGACATTGTCAATGGTTTC
```

Sequência referente ao gene codificador da  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase II (KAS II)

```
>BIEM-NT-001-014-C06-CE.F
ATTCAGAACAGAACAGAACAAAATCTCTCATTTGCTGATTAGCCTTTTAAATAAAAATAAGTTTAAAGAAAAAAAAAATGAAATT
GGTCCAGACTTCTTTGGCTATCTAGAATCCAACCTCAAAATTTATTACAACACTAACGATTACAAATTGCTCAAGAAAGTTACAA
GAATGAAGCAGCCTGATCACAGATTAATAGCTGACTCATCTTCCATAATAAATGCAAACTAAGTGACCAACCACCCGATGAGAT
TTTCATGGCTTGAAGCAGAAAATGCCACGACCCGAGTTGTGTCCACCAAATCCAAAAGAGTTGGAAATTGCAACATTAACCTC
ATGTCTGCTGCTTTACATTGGCAACAGTGTCAAACCTCAACTGAAGGCTCTGGATTAAATTGATTTATGGAGGGATGCAGCCATC
CTGTCGTAATGGCCTTACAGTGGCAATGGCTTCTAAACCACCCGCTGCACCCAGGCAGTGCCTATCATAGACTTTGTTGCA
TTGATTTTGATGTCTGATGATTCTTGAATACTTTTTTAATAGCATTTATCTCAGNCAGGTACCAGCAAGGGTAGAAGTNGC
ATGTGCGTTAATATGGTTACCTCCTCAGGGGACACACAGCATCTTCAAGGCTTCTCTCAATGCAGGAAGACACCCCAAGACCA
TCAGCTCTTGGATCAGTCATATGATAAGCATC
```

Sequência referente ao gene codificador da acil-ACP tioesterase tipo B (Fat B)

```
>BIEM-NT-001-001-C01-CE.F
GGCACCGTTCGGTCGGAATCCGGGTCGACCACGCGTCNGAATCTCTCTCTCTCTCTCCAAAACTAAAAGAAAAGTTTTTTT
TACTTTTTTTTTTCGATTTTTTCTTAATTTTCGTTACTTTTTGAAATTCGAAACAGGATTTTCAGAAAAATATAAACTCTTCAAAA
AGCCAGAAAGAAAGCGAAGACGAGAGAAAGGAAAAGTAGTGCTAGATCGCAAGCCCTAGAAGTAGCGAGAAGGGTTTGTAGA
TCCTAAATAACGCAATAGCTTCTACTCTTTGCATTGTTCTCGAGAAAATTTCCCTCATTGATTCGTCTGGTTTTTTTTTGGTT
GAGTTGGAGGATGCAGCAGTTGCTTCTTTAAAAGCTTACACTTTGCGAAGAGGGAATTTAACGGAACATTCGTGTGTTAGC
GGATAATTGAGGTTTTTAAATTTTCAAAATCATGGTTGCTACTGCTGCTACATCTGCATTCTTCCGGTCACTTCATCCCCGG
ACTCCTCTGACTCGAAAAACAAGAAGCTTGAAGTGGATCTACTAACCTTGGAGGTATCAAGTCGAAACCATCTACTTCTTCT
GGAATTTTCAAGTCAAGGCAAAATGCTCAAGCTCCTCCAAAAATAAATGGTACCACGGTCGTGACAACCTCCAG
```

## Sequência referente ao gene codificador da oleosina

>BIEM-NT-001-008-E03-CE.F

TCGGGTAGAAACAGCGTCCGATTCTTATTCCTTCGATTTAAAGAAGTTTGAAC TATTTGCAACCATGGCTGAGCACCTCCAGC  
TGCAGCCCCAATACCATCACCCGTA CTCTCAACCAAGGTCCACCAGATGGTGAAGGCGGCTACTGCTGCCACTGCTGGAGGA  
TCCCTTCTAAATCCTCTCCGGTTGATCCTTGCTGGTACGGTTATTGCACTCACCATTGCTACTCCACTCTTTGTCATATTCAG  
TCCGGTCTTGTCCTCGCTCTCATTGGCGCAGCTCTCCTGGTGACAGGTTTCATGGCTTCTGGCGGTTTCGGTGTGCGCAGCTA  
TTACTGTGCTGTCATGGATTATAGGTATGTTACCGTGGGGCACCCACCAGGAGCGGATCAGTTGGACCAGGCGGTATGAGG  
CTGGCTAGAAAGGCTCGGGAGATGAACGAAAGGCCTGAGCAGCTCACCAGTGCAGCGGCTTCGTAGTTTGTGCTGCTTAATTA  
GCAATTGATCGTTACCTAGCTAGGATCAAATGGCTATCATAACAAGTCCTTCTCTTAAGTCTTAAGTCATTAGAATGTTCTGT  
TATTTCTATGACAATGTTCTGAATTTGGAAGGCNACCACANAGAAAGTCTGAACTTGATCTGNGTCTGNTGAAGACTGAAGT  
AATTTACTGTCATAAGCAGNTGTTACTTGN TATTGCTGCTATCCGNNGAAGTGGNTNTANTNTAATATTTTCTG

APÊNDICE B - Sequências referentes às proteínas carregadoras de acil B e C (ACP B e ACP C), <sup>Δ9</sup>estearoil-ACP desaturase (SAD A e SAD B), acil-ACP tioesterase tipo A (Fat A) e acil-CoA sintetase (ACS A e ACS B) ClustalW (<http://align.genome.jp/>) para a identificação das regiões mais conservadas e assim, realizar a construção dos iniciadores. Marcados em cinza, estão os iniciadores correspondentes.

Alinhamento realizado no programa ClustalW das sequências correspondentes a proteína carregadora de acil B (ACP B)

```

KZ0AAT4YN04FM1 |      1  GAACGTCTACCCATTTTCACCCAAGAGAGAGGGCTACTTATCGAAATGGCGGCAGTGAGA
KZ0AAT5YN04FM1 |      1  GAACGTCTACCCATTTTCACCCAAGAGAGAGGGCTACTTATCGAAATGGCGGCAGTGAGA
KZ0AAV7YJ06FM1 |      1  GAACGTCTACCCATTTTCACCCAAGAGAGAGGGCTACTTATCGAAATGGCGGCAGTGAGA
KZ0ACAK2YA09FM1 |      1  GAACGTCTACCCATTTTCACCCAAGAGAGAGGGCTACTTATCGAAATGGCGGCAGTGAGA
KZ0AAV10YP23FM1 |      1  -----
consensus          1  gaacgtctaccatTTTCACCCAAGAGAGAGGGCTacttatcgaaatggcggcagtgaga

KZ0AAT4YN04FM1 |     61  GGAGCTTTGCTAAAGCACTTGAGGGTGAACGCAACGCCCTTGCCCGTAACCCTAACCT
KZ0AAT5YN04FM1 |     61  GGAGCTTTGCTAAAGCACTTGAGGGTGAACGCAACGCCCTTGCCCGTAACCCTAACCT
KZ0AAV7YJ06FM1 |     61  GGAGCTTTGCTAAAGCACTTGAGGGTGAACGCAACGCCCTTGCCCGTAACCCTAACCT
KZ0ACAK2YA09FM1 |     61  GGAGCTTTGCTAAAGCACTTGAGGGTGAACGCAACGCCCTTGCCCGTAACCCTAACCT
KZ0AAV10YP23FM1 |      1  -----GGTGAACGCAACGCCCTTGCCCGTAACCCTAACCT
consensus          61  ggagctttgctaaagcacttgagGGTGAACGCAACGCCCTTGCCCGTAACCCTAACCT

KZ0AAT4YN04FM1 |    121  ACCAGTCACGGGCTCTTTGCTCTTACCTTCAACGCCATACGCCCGGTTTCTGCGATGAG
KZ0AAT5YN04FM1 |    121  ACCAGTCACGGGCTCTTTGCTCTTACCTTCAACGCCATACGCCCGGTTTCTGCGATGAG
KZ0AAV7YJ06FM1 |    121  ACCAGTCACGGGCTCTTTGCTCTTACCTTCAACGCCATACGCCCGGTTTCTGCGATGAG
KZ0ACAK2YA09FM1 |    121  ACCAGTCACGGGCTCTTTGCTCTTACCTTCAACGCCATACGCCCGGTTTCTGCGATGAG
KZ0AAV10YP23FM1 |     38  ACCAGTCACGGGCTCTTTGCTCTTACCTTCAACGCCATACGCCCGGTTTCTGCGATGAG
consensus          121  ACCAGTCACGGGCTCTTTGCTCTTACCTTCAACGCCATACGCCCGGTTTCTGCGATGAG

KZ0AAT4YN04FM1 |    181  GTCAAGGGCTCCTTCTCGACAAATCTGAAGTCACCGATCGCGTCATCTCCGTTGTTAAA
KZ0AAT5YN04FM1 |    181  GTCAAGGGCTCCTTCTCGACAAATCTGAAGTCACCGATCGCGTCATCTCCGTTGTTAAA
KZ0AAV7YJ06FM1 |    181  GTCAAGGGCTCCTTCTCGACAAATCTGAAGTCACCGATCGCGTCATCTCCGTTGTTAAA
KZ0ACAK2YA09FM1 |    181  GTCAAGGGCTCCTTCTCGACAAATCTGAAGTCACCGATCGCGTCATCTCCGTTGTTAAA
KZ0AAV10YP23FM1 |     98  GTCAAGGGCTCCTTCTCGACAAATCTGAAGTCACCGATCGCGTCATCTCCGTTGTTAAA
consensus          181  GTCAAGGGCTCCTTCTCGACAAATCTGAAGTCACCGATCGCGTCATctCCGTTGTTAAA

```

Continua

KZ0AAT4YN04FM1	241	AACTTCCAGAAAGTTGATCCTTCCAAGGTTAACCCAAATGCGCATTTTCAAAATGATCTT
KZ0AAT5YN04FM1	241	AACTTCCAGAGAGTTGATCCTTCCAAGGTTAACCCAAATGCGCATTTTCAAAATGATCTT
KZ0AAV7YJ06FM1	241	AACTTCCAGAAAGTTGATCCTTCCAAGGTTAACCCAAATGCGCATTTTCAAAATGATCTT
KZ0ACAK2YA09FM1	241	AACTTCCAGAAAGTTGATCCTTCCAAGGTTAACCCAAATGCGCATTTTCAAAATGATCTT
KZ0AAV10YP23FM1	158	AACTTCCAGAAAGTTGATCCTTCCAAGGTTAACCCAAATGCGCATTTTCAAAATGATCTT
consensus	241	AACTTCCAGAAAGTTGATCCTTCCAAGGTTAACCCAAATGCGCATTTTCAAAATGATCTT
KZ0AAT4YN04FM1	301	GGATTGGATAGTTTAGACTGTGGAGGTTGTCATGGCCCTTGAAGAAGAATTTGGGTTT
KZ0AAT5YN04FM1	301	GGATTGGATAGTTTAGACTGTGGAGGTTGTCATGGCCCTTGAAGAAGAATTTGGGTTT
KZ0AAV7YJ06FM1	301	GGATTGGATAGTTTAGACTGTGGAGGTTGTCATGGCCCTTGAAGAAGAATTTGGGTTT
KZ0ACAK2YA09FM1	301	GGATTGGATAGTTTAGACTGTGGAGGTTGTCATGGCCCTTGAAGAAGAATTTGGGTTT
KZ0AAV10YP23FM1	218	GGATTGGATAGTTTAGACTGTGGAGGTTGTCATGGCCCTTGAAGAAGAATTTGGGTTT
consensus	301	GGATTGGATAGTTTAGACTGTGGAGGTTGTCATGGCCCTTGAAGAAGAATTTGGGTTT
KZ0AAT4YN04FM1	361	GAGATTCCTGATAATGAGGCAGACAAGATCAGCACAATCAATCTTGCTGTTGAGTTCATT
KZ0AAT5YN04FM1	361	GAGATTCCTGATAATGAGGCAGACAAGATCAGCACAATCAATCTTGCTGTTGAGTTCATT
KZ0AAV7YJ06FM1	361	GAGATTCCTGATAATGAGGCAGACAAGATCAGCACAATCAATCTTGCTGTTGAGTTCATT
KZ0ACAK2YA09FM1	361	GAGATTCCTGATAATGAGGCAGACAAGATCAGCACAATCAATCTTGCTGTTGAGTTCATT
KZ0AAV10YP23FM1	278	GAGATTCCTGATAATGAGGCAGACAAGATCAGCACAATCAATCTTGCTGTTGAGTTCATT
consensus	361	GAGATTCCTGATAATGAGGCAGACAAGATCAGCACAATCAATCTTGCTGTTGAGTTCATT
KZ0AAT4YN04FM1	421	GCTTCTCACCTCAGGCAAAGTAGGTGGGAAATTACGAAGCTCTACTCTTTATATTTTGT
KZ0AAT5YN04FM1	421	GCTTCTCACCTCAGGCAAAGTAGGTGGGAAATTACGAAGCTCTACTCTTTATATTTTGT
KZ0AAV7YJ06FM1	421	GCTTCTCACCTCAGGCAAAGTAGGTGGGAAATTACGAAGCTCTACTCTTTATATTTTGT
KZ0ACAK2YA09FM1	421	GCTTCTCACCTCAGGCAAAGTAGGTGGGAAATTACGAAGCTCTACTCTTTATATTTTGT
KZ0AAV10YP23FM1	338	GCTTCTCACCTCAGGCAAAGTAGGTGGGAAATTACGAAGCTCTACTCTTTATATTTTGT
consensus	421	GCTTCTCACCTCAGGCAAAGTAGGTGGGAAATTACGAAGCTCTACTCTTTATATTTTGT
KZ0AAT4YN04FM1	481	TTTCACTTTGTTTCTGTGAGATCAAGAGCTGCATTAGGAGAATTATGGGATCTTCCCATC
KZ0AAT5YN04FM1	481	TTTCACTTTGTTTCTGTGAGATCAAGAGCTGCATTAGGAGAATTATGGGATCTTCCCATC
KZ0AAV7YJ06FM1	481	TTTCACTTTGTTTCTGTGAGATCAAGAGCTGCATTAGGAGAATTATGGGATCTTCCCATC
KZ0ACAK2YA09FM1	481	TTTCACTTTGTTTCTGTGAGATCAAGAGCTGCATTAGGAGAATTATGGGATCTTCCCATC
KZ0AAV10YP23FM1	398	TTTCACTTTGTTTCTGTGAGATCAAGAGCTGCATTAGGAGAATTATGGGATCTTCCCATC
consensus	481	TTTCACTTTGTTTCTGTGAGATCAAGAGCTGCATTAGGAGAATTATGGGATCTTCCCATC

Concluído





KZ0ACAA9YN13FM1 | 1 -----CGGTAAGGAAACAACCTGGCTCTACCAAATGACAAACCAGTCACTGGT  
 KZ0AAP10YF21FM1 | 187 AAGGTATGTGCAATAGTAAGGAAACAACCTAGCTTTACCAAATGACAAACCAGTCACTGGT  
 KZ0AAQ4YG22FM1 | 210 AAGGTATGTGCAATAGTAAGGAAACAACCTGGCTCTACCAAATGACAAACCAGTCACTGGT  
 KZ0ABB16YJ11FM1 | 193 AAGGTATGTGCAATAGTAAGGAAACAACCTAGCTCTACCAAATGACAAACCAGTCACTGGT  
 KZ0AAV7YM01FM1 | 235 AAAGTTTGTGAAATAGTGAGGAAGCAACTGGCACTACCTGATGATTCTTCGTCACCGGG  
  
 KZ0ACAA10YN10FM1 | 83 GATTCAAATTTGCTGACCTTGGAGCTGATTCCCTTGATACGGTTGAGATTGTGATGGGA  
 KZ0AAP6YA04FM1 | 1 -----GATTCCCTTGATACGGTTGAGATTGTGATGGGA  
 KZ0ACAA9YN13FM1 | 49 GATTCAAATTTGCTGACCTTGGAGCTGATTCCCTTGATACGGTTGAGATTGTGATGGGA  
 KZ0AAP10YF21FM1 | 247 GATTCAAATTTGCTGACCTTGGAGCTGATTCCCTTGATACGGTTGAGATTGTGATGGGA  
 KZ0AAQ4YG22FM1 | 270 GATTCAAATTTGCTGACCTTGGAGCTGATTCCCTTGATACGGTTGAGATTGTGATGGGA  
 KZ0ABB16YJ11FM1 | 253 GATTCAAATTTGCTGACCTTGGAGCTGATTCCCTTGATACGGTTGAGATTGTGATGGGA  
 KZ0AAV7YM01FM1 | 295 GAGTCAAAGTTTCTACACTTGGAGCTGATTCCCTTGACACGGTCGAGATTGTGATGGGA  
  
 KZ0ACAA10YN10FM1 | 143 ATTGAGGAAGAATTTGGAATTGCTGTGGAAGAGGACAATGCCCAAAGCATCACAACCTGTT  
 KZ0AAP6YA04FM1 | 34 ATTGAGGAAGAATTTGGAATTGCTGTGGAAGAGGACAATGCCCAAAGCATCACAACCTGTT  
 KZ0ACAA9YN13FM1 | 109 ATTGAGGAAGAATTTGGAATTGCTGTGGAAGAGGACAATGCCCAAAGCATCACAACCTGTT  
 KZ0AAP10YF21FM1 | 307 ATTGAGGAAGAATTTGGAATTGCTGTGGAAGAGGGCAATGCCCAAAGCATCACAACCTGTT  
 KZ0AAQ4YG22FM1 | 330 ATTGAGGAAGAATTTGGAATTGCTGTGGAAGAGGACAATGCCCAAAGCATCACAACCTGTT  
 KZ0ABB16YJ11FM1 | 313 ATTGAGGAAGAATTTGGAATTGCTGTGGAAGAGGACAATGCCCAAACATCAAAGCTGTT  
 KZ0AAV7YM01FM1 | 355 C-----  
  
 KZ0ACAA10YN10FM1 | 203 CAGGATGCTGCAGATCTTGTAGAGAAGCTCTGCAGCGAGAAAAGTGCCTAGAGAATAGGA  
 KZ0AAP6YA04FM1 | 94 CAGGATGCTGCAGATCTTGTAGAGAAGCTCTGCAGCGAGAAAAGTGCCTAGAGAATAGGA  
 KZ0ACAA9YN13FM1 | 169 CAGGATGCTGCAGATCTTGTAGAGAAGCTCTGCAGCGAGAAAAGTGCCTAGAGAATAGGA  
 KZ0AAP10YF21FM1 | 367 CAGGATGCTGCAGATTTTGTAGAGAAGCTTTGCAGCGAGAAAAGTGCCTAGAGAATAGGA  
 KZ0AAQ4YG22FM1 | 390 CAGGATGCTGCACATCATGTAGAGAAGCTCTGCACGAGAAAAGTGCCTAGAGAATAGCA  
 KZ0ABB16YJ11FM1 | 373 CAGGAAGCTG-----  
 KZ0AAV7YM01FM1 | -----

Concluído

Alinhamento realizado no programa ClustalW das sequências correspondentes a enzima  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase A (SAD A)

KZ0AAS8YE23FM1	1	<b>ATAGCCAGAGGGGTCTTAAGCACCAAATAAGCAGAGAAAAAACGAAACCAAGCAAACG</b>
KZ0ABE2YI15FM2	1	<b>ATAGCCAGAGGGGTCTTAAGCACCAAATAAGCAGAGAAAAAACGAAACCAAGCAAACG</b>
KZ0AAS8YE23FM1	61	<b>CAGAACAAATGGCTCTGAAATTGAATCCCATCACTTCTCAATCTCAGAACTTCCGTATT</b>
KZ0ABE2YI15FM2	61	<b>CAGAACAAATGGCTCTGAAATTGAATCCCATCACTTCTCAATCTCAGAACTTCCGTATT</b>
KZ0AAS8YE23FM1	121	<b>TTGCTCTTCCACCAATGGCCAGCCTCAGATCTCCCAAGTTTTTCATGGCTCCACTCTTC</b>
KZ0ABE2YI15FM2	121	<b>TTGCTCTTCCACCAATGGCCAGCCTCAGATCTCCCAAGTTTTTCATGGCTCCACTCTTC</b>
KZ0AAS8YE23FM1	181	<b>GTTCTGGCTCCAAAGAGGTTGAGAATGTCAAAAAGCCTTTCATGCCTCCTCGGGAGGTGC</b>
KZ0ABE2YI15FM2	181	<b>GTTCTGGCTCCAAAGAGGTTGAGAATGTCAAAAAGCCTTTCATGCCTCCTCGGGAGGTTC</b>
KZ0AAS8YE23FM1	241	<b>ATGTTCAGGTCACCCACTCCATGCCACCACAAAAGATTGAGATCTTTAAATCTTTGGAGA</b>
KZ0ABE2YI15FM2	241	<b>ATGTTCAGGTCACCCACTCCATGCCACCACAAAAGATTGAGATCTTTAAATCTTTGGAGA</b>
KZ0AAS8YE23FM1	301	<b>ACTGGGCTGAGCAGAACATTTTAGTTACCTCAAACCAGTTGAGAAATGTTGGCAACCC</b>
KZ0ABE2YI15FM2	301	<b>ACTGGGCTGAGCAGAACATTTTAGTTACCTCAAACCAGTTGAGAAATGTTGGCAACCC</b>
KZ0AAS8YE23FM1	361	<b>AGGATTTTCTTCCAATCCTGCTTCTGATGGATTTGATGAGCAAGTAAAAGAACTAAGGG</b>
KZ0ABE2YI15FM2	361	<b>AGGATTTTCTTCCAATCCTGCTTCTGATGGATTTGATGAGCAAGTAAAAGAACTAAGGG</b>
KZ0AAS8YE23FM1	421	<b>AAAGGGCTAAGGAGATTCCAGATGATTACTTTGTTGTTTTGGTTGGTGATATGATCACAG</b>
KZ0ABE2YI15FM2	421	<b>AAAGGGCTAAGGAGATTCCAGATGATTACTTTGTTGTTTTGGTTGGTGATATGATCACAG</b>
KZ0AAS8YE23FM1	481	<b>AGGAAGCCCTTCCAACCTACCAAACAATGCTTAATACCTTAGATGGAGTTCTTGATGAAA</b>
KZ0ABE2YI15FM2	481	<b>AGGAAGCCCTTCCAACCTACCAAACAATGCTTAATACCTTAGATGGAGTTCTTGATGAAA</b>
KZ0AAS8YE23FM1	541	<b>CGGGTGCTAGCCTCACCTCTTGGGCAATTTGGACGAGGGCATGGACAGCTGAAGAAAATA</b>
KZ0ABE2YI15FM2	541	<b>CGGGTGCTAC-----</b>
KZ0AAS8YE23FM1	601	<b>GGCATGGTGATCTACTTAATAAGTATCTCTACTTGTCTGGAAGAGTGGACATGAGACAAA</b>
KZ0ABE2YI15FM2		<b>-----</b>

Continua

KZ0AAS8YE23FM1 | 661 TTGAGAAGACAATCCAGTATTTGATTGGATCAGGAATGGATCC  
 KZ0ABE2YI15FM2 | -----

Concluído

Alinhamento realizado no programa ClustalW das sequências correspondentes a enzima  $\Delta^9$ estearoil-ACP desaturase B (SAD B)

KZ0AAV9YN21FM1 | 1 GTTTTGGTTGGTGATATGATCACAGAGGAAGCCCTTCCAACCTACCAAACAATGCTTAAT  
 KZ0ABB11YH03FM1 | 1 GTTTTGGTTGGTGATATGATCACAGAGGAAGCCCTTCCAACCTACCAAACAATGCTTAAT

KZ0AAV9YN21FM1 | 61 ACCTTAGATGGAGTTCTTGATGAAACGGGTGCTAGCCTCACCTCTTGGGCAATTTGGACG  
 KZ0ABB11YH03FM1 | 61 ACCTTAGATGGAGTTCTTGATGAAACGGGTGCTGGCCTCACCTCTTGGGCAATTTGGACG

KZ0AAV9YN21FM1 | 121 AGGGCATGGACAGCTGAAGAAAATAGGCATGGTGATCTACTTAATAAGTATCTCTACTTG  
 KZ0ABB11YH03FM1 | 121 AGGGCATGGACAGCTGAAGAAAATAGGCATGGTGATCTACTTAATAAGTATCTCTACTTG

KZ0AAV9YN21FM1 | 181 TCTGGAAGAGTGGACATGAGACAAAATTGAGAAGACAATCCAGTATTTGATTGGATCAGGA  
 KZ0ABB11YH03FM1 | 181 TCTGGAAGAGTGGACATGAGACAAAATTGAGAAGACAATCCAGTATTTGATTGGATCAGGA

KZ0AAV9YN21FM1 | 241 ATGGATCCCCGCACAGAAAACAGCCCTTATCTTGGATTTCATCTACACATCATTTCCAAGAA  
 KZ0ABB11YH03FM1 | 241 ATGGATCCCCGCACAGAAAACAGCCCTTATCTTGGATTTCATCTACACATCATTTCCAAGAA

KZ0AAV9YN21FM1 | 301 AGGGCAACTTTTATCTCCCATGGGAATACAGCCAGACTTGCCAAGGAGCATGGGGACTTT  
 KZ0ABB11YH03FM1 | 301 AGGGCAACTTTTATCTCCCATGGGAATACAGCCAGACTTGCCAAGGAGCATGGGGACTTT

KZ0AAV9YN21FM1 | 361 AAGTTGGTTCAAATATGTGGGACGATTGCCTCGGATGAAAGGCGCCATGAGACAGCTTAT  
 KZ0ABB11YH03FM1 | 361 AAGTTGGCTCAAATATGTGGGACGATTGCCTCGGATGAAAGGCGCCATGAGACAGCTTAT

KZ0AAV9YN21FM1 | 421 ACTAAAATCGTGGAAAAGCTCTTTGAGATTGATCCTGATGGTACTGTCTCTGGCCTTTGCT  
 KZ0ABB11YH03FM1 | 421 ACTAAAATCGTGGAAAAGCTCTTTGAGATTGATCCTGATGGTACTGTCTCTGGCCTTTGCT

KZ0AAV9YN21FM1 | 481 GACATGATCAGAAAAGAAAATCTCGATGCCTGCCACTTGATGTATGATGGCCGAGATG  
 KZ0ABB11YH03FM1 | 481 GACATGATGGAGAAAAGAAAATCTCGATGCCTGCCCCACTTGATGTATG-----

Continua

```

KZ0AAV9YN21FM1 |      539  ACAACCTTTTCGACCACCTTCTCAGCTGTTGCACAAAGACTTGGGGTTTACACTGCCAAGG
KZ0ABB11YH03FM1 |      -----

KZ0AAV9YN21FM1 |      599  ACTACGCTGATATTCTGGAGTTCTGGTGGAGAGATGGAAGGTGAAGGAGCTGACTGGAC
KZ0ABB11YH03FM1 |      -----

KZ0AAV9YN21FM1 |      659  TTT
KZ0ABB11YH03FM1 |      ---

```

Concluído

Alinhamento realizado no programa ClustalW das seqüências correspondentes a enzima acil-ACP tioesterase tipo A (Fat A)

```

KZ0AAQ8YO09FM1 | Br_FatA1      1  AGGCTCCTGTCCTTGTTCCCC CAAGAAAAATAAAGAAGAGAGAGATGTTGAAGCTTTCCT
KZ0ABA10YN04FM1 | Br_FatA1      1  AGGCTCCTGTCCTTGTTCCCC AAAGAAAAATAAAGAAGAGAGAGATGTTGAAGCTTTCCT
KZ0AAS7YC06FM1 | Br_FatA1      1  AGGCTCCTGTCCTTGTTCCCC AAAGAAAAATAAAGAAGAGAGAGATGTTGAAGCTTTCCT
KZ0ABA10YG11FM1 | Br_FatA1      1  AGGCTCCTGTCCTTGTTCCCC AAAGAAAAATAAAGAAGAGAGAGATGTTGAAGCTTTCCT
BIEM-NT-001-006-D04-CE.F      1  ----- GAAGCTTTCCT

KZ0AAQ8YO09FM1 | Br_FatA1     61  CCTGCATGTGACCGGAC CAAGACAGGCCTTGGCCCATGCAGATTCCCTCGCTCGCCG
KZ0ABA10YN04FM1 | Br_FatA1     61  CCTGCAATGTGACGGACCAAGACAGGCCTTGGCCCAATGCAGATTCCCTCGCTCCGCCTG
KZ0AAS7YC06FM1 | Br_FatA1     61  CCTGCAATGTGACGGACCAAGACAGGCCTTGGCCCAATGCAGATTCCCTCGCTCCGCCTG
KZ0ABA10YG11FM1 | Br_FatA1     61  CCTGCAATGTGACGGACCAAGACAGGCCTTGGCCCAATGCAGATTCCCTCGCTCCGCCTG
BIEM-NT-001-006-D04-CE.F     12  CCTGCAATGTGACGGACCAAGACAGGCCTTGGCCCAATGCAGATTCCCTCGCTCCGCCTG

KZ0AAQ8YO09FM1 | Br_FatA1    121  CTCGCTTCTCCTTTTCGCTGGCGTACCCCG -TCGTCGTCTCCTGCTCTCCTTCCAGCAGAC
KZ0ABA10YN04FM1 | Br_FatA1    121  CTCGCTTCTCCTTTTCGCTGGCGTACCCCGTCGTCGTCTCCTGCTCTCCTTCCAGCAGAC
KZ0AAS7YC06FM1 | Br_FatA1    121  CTCGCTTCTCCTTTTCGCTGGCGTACCCCGTCGTCGTCTCCTGCTCTCCTTCCAGCAGAC
KZ0ABA10YG11FM1 | Br_FatA1    121  CTCGCTTCTCCTTTTCGCTGGCGTACCCCGTCGTCGTCTCCTGCTCTCCTTCCAGCAGAC
BIEM-NT-001-006-D04-CE.F     72  CTCGCTTCTCCTTTTCGCTGGCGTACCCCGTCGTCGTCTCCTGCTCTCCTTCCAGCAGAC

KZ0AAQ8YO09FM1 | Br_FatA1    180  CTAACCTGTGCGCTCTTCAAGTTGTCCTGTGCGGGCCAGCAGCAAGCTGGGATGGAGCTGG
KZ0ABA10YN04FM1 | Br_FatA1    181  CTAACCTGTGCGCTCTTCAAGTTGTCCTGTGCGGGCCAGCAGCAAGCTGGGATGGAGCTGG
KZ0AAS7YC06FM1 | Br_FatA1    181  CTAACCTGTGCGCTCTTCAAGTTGTCCTGTGCGGGCCAGCAGCAAGCTGGGATGGAGCTGG
KZ0ABA10YG11FM1 | Br_FatA1    181  CTAACCTGTGCGCTCTTCAAGTTGTCCTGTGCGGGCCAGCAGCAAGCTGGGATGGAGCTGG
BIEM-NT-001-006-D04-CE.F    132  CTAACCTGTGCGCTCTTCAAGTTGTCCTGTGCGGGCCAGCAGCAAGCTGGGATGGAGCTGG

```

Continua

KZ0AAQ8YO09FM1 | Br\_FatA1 240 TCGAATCCGGGTCGGGGAGTTTGGCTGACCGGCTCCGGTTGGGTAGCTTGACGGAAGATG  
 KZ0ABA10YN04FM1 | Br\_FatA1 241 TCGAATCCGGGTCGGGGAGTTTGGCTGACCGGCTCCGGTTGGGTAGCTTGACGGAAGATG  
 KZ0AAS7YC06FM1 | Br\_FatA1 241 TCGAATCCGGGTCGGGGAGTTTGGCTGACCGGCTCCGGTTGGGTAGCTTGACGGAAGATG  
 KZ0ABA10YG11FM1 | Br\_FatA1 241 TCGAATCCGGGTCGGGGAGTTTGGCTGACCGGCTCCGGTTGGGTAGCTTGACGGAAGATG  
 BIEM-NT-001-006-D04-CE.F 192 TCGAATCCGGGTCGGGGAGTTTGGCTGACCGGCTCCGGTTGGGTAGCTTGACGGAAGATG  
  
 KZ0AAQ8YO09FM1 | Br\_FatA1 300 GTTTGTCCTATAAGGAGAAGTTTATTGTGAGGTGTTATGAGGTGGGAATTAACAAAACCTG  
 KZ0ABA10YN04FM1 | Br\_FatA1 301 GTTTGTCCTATAAGGAGAAGTTTATTGTGAGGTGTTATGAGGTGGGAATTAACAAAACCTG  
 KZ0AAS7YC06FM1 | Br\_FatA1 301 GTTTGTCCTATAAGGAGAAGTTTATTGTGAGGTGTTATGAGGTGGGAATTAACAAAACCTG  
 KZ0ABA10YG11FM1 | Br\_FatA1 301 GTTTGTCCTATAAGGAGAAGTTTATTGTGAGGTGTTATGAGGTGGGAATTAACAAAACCTG  
 BIEM-NT-001-006-D04-CE.F 252 GTTTGTCCTATAAGGAGAAGTTTATTGTGAGGTGTTATGAGGTGGGAATTAACAAAACCTG  
  
 KZ0AAQ8YO09FM1 | Br\_FatA1 360 CCACTGTTGAAACCATTGCCAATCTCTTG CAGGAGGTTGGATGTAACCATGCTCAAAGTG  
 KZ0ABA10YN04FM1 | Br\_FatA1 361 CCACTGTTGAAACCATTGCCAATCTCTTG CAGGAGGTTGGATGTAACCATGCTCAAAGTG  
 KZ0AAS7YC06FM1 | Br\_FatA1 361 CCACTGTTGAAACCATTGCCAATCTCTTG CAGGAGGTTGGATGTAACCATGCTCAAAGTG  
 KZ0ABA10YG11FM1 | Br\_FatA1 361 CCACTGTTGAAACCATTGCCAATCTCTTG CAGGAGGTTGGATGTAACCATGCTCAAAGTG  
 BIEM-NT-001-006-D04-CE.F 312 CCACTGTTGAAACCATTGCCAATCTCTTG CAGGAGGTTGGATGTAACCATGCTCAAAGTG  
  
 KZ0AAQ8YO09FM1 | Br\_FatA1 420 TTGGATATCCACAGATGGGTTTGCTACCACTCGCACCATGAGAAAATTGCATCTCATT  
 KZ0ABA10YN04FM1 | Br\_FatA1 421 TTGGATATCCACAGATGGGTTTGCTACCACTCGCACCATGAGAAAATTGCATCTCATT  
 KZ0AAS7YC06FM1 | Br\_FatA1 421 TTGGATATCCACAGATGGGTTTGCTACCACTCGCACCATGAGAAAATTGCATCTCATT  
 KZ0ABA10YG11FM1 | Br\_FatA1 421 TT-----  
 BIEM-NT-001-006-D04-CE.F 372 TTGGATATCCACAGATGGGTTTGCTACCACTCGCACCATGAGAAAATTGCATCTCATT  
  
 KZ0AAQ8YO09FM1 | Br\_FatA1 480 GAGTAACTGCACGCATGCACATTGAAATATACAAATACCCTGCTTGGAGTGATGTGATTG  
 KZ0ABA10YN04FM1 | Br\_FatA1 481 GGGTAACTGCACGCATGCACATTGAAATATACAAATACCCTGCTTGGAGTGATGTGATTG  
 KZ0AAS7YC06FM1 | Br\_FatA1 481 GGGTAACTGCACGCATGCACATTGAAATATACAAATACCCTGCTTGGAGTGATGTGATTG  
 KZ0ABA10YG11FM1 | Br\_FatA1 -----  
 BIEM-NT-001-006-D04-CE.F 432 GGGTAACTGCACGCATGCACATTGAAATATACAAATACCCTGCTTGGAGTGATGTGATTG  
  
 KZ0AAQ8YO09FM1 | Br\_FatA1 540 AAATAGAGACATGGTGCCAAAGTGAGGGAAGAATTGGAA-----  
 KZ0ABA10YN04FM1 | Br\_FatA1 541 AAATAGAGACATGGTGCCAA-----  
 KZ0AAS7YC06FM1 | Br\_FatA1 541 AAATAGAGACATGGTGCCAAAGTGAGGGAAGAATTGGAA-----  
 KZ0ABA10YG11FM1 | Br\_FatA1 -----  
 BIEM-NT-001-006-D04-CE.F 492 AAATAGAGACATGGTGCCAAAGTGAGGGAAGAATTGGAA-----  
 CCAGAAGGGACTGGATTCTTA

Alinhamento realizado no programa ClustalW das seqüências correspondentes a enzima acil-CoA sintetase A (ACS A)

```

KZ0ACAA9YA14FM1 | 1  AGGTGGCTATACAACATCTGCAAACCGCCTCGAGGAGAGGTTGTTGTGGGGATT
KZ0AAT4YP17FM1 | 1  -----
KZ0AAT10YC21FM1 | 1  AGGTGGATATTTAACTAGTCATTCACAATGCCTCGGGAGAAATAGTGGTCGGTGGTCC

KZ0ACAA9YA14FM1 | 61  TAGTGTAACACTGGCTATTTCGACAATCCTGGAAAACTAATGAAGTGTACAAGGTTGA
KZ0AAT4YP17FM1 | 1  -----
KZ0AAT10YC21FM1 | 61  AAGTGTAACACTGGATACTTCAAAAATGGAAGAAAAAACAAAAGAAGTGTACAAGGTTGA

KZ0ACAA9YA14FM1 | 121  TGAGAGGGCATCGCTGGTTTTACTGGAGACATGGACAATTCATCCTGATGGATG
KZ0AAT4YP17FM1 | 1  -----
KZ0AAT10YC21FM1 | 121  TGAGAGAGGAATGAGGTGGTTCTAACTGGTGATATAGGACGTTCATGCTGATGGTTG

KZ0ACAA9YA14FM1 | 181  CCTTGAGATTATTGATAGGAAAAAAGGATATGTCAAACTTCAACATGGAGAGTATATATC
KZ0AAT4YP17FM1 | 133  CCTTGAGATAATTGACCGTAAAAAGGACATAGTCAAACTTCAGCACGGGGAATATGTCTC
KZ0AAT10YC21FM1 | 181  CCTTGAGATAATTGACCGTAAAAAGGACATAGTCAAACTTCAGCACGGGGAATATGTCTC

KZ0ACAA9YA14FM1 | 241  TCTTGGAAAGGTTGAGGCAGCACTGATCTTAGTAACTTGTTGACAATATGATGGTATA
KZ0AAT4YP17FM1 | 73  TTTAGGAAAGGTTGAGGCTGCTCTCATCATCAGTACCTATGTCGACAATATTATGTTGCA
KZ0AAT10YC21FM1 | 241  TTTAGGAAAGGTTGAGGCTGCTCTCATCATCAGTACCTATGTCGACAATATTATGTTGCA

KZ0ACAA9YA14FM1 | 301  CGCAGATCCGTTTCACAATTATTGTGTAGCTTAAATTGTTCATCACCCCGTTCTTGA
KZ0AAT4YP17FM1 | 133  TGCTGATCCATTTCATAGTTATTGCGTGGCTCTTGTGGTGGCTTCTCAGCATGCAGTGGA
KZ0AAT10YC21FM1 | 301  TGCTGATCCATTTCATAGTTATTGCGTGGCTCTTGTGGTGGCTTCTCAGCATGCAGTGGA

KZ0ACAA9YA14FM1 | 361  GAGTGGGCTCTAGAGCTGGCATTAGTACAAAGATTTTCCGGAGCTGTGTGGTAAACC
KZ0AAT4YP17FM1 | 193  AGATTGGGCTTCAAAGCAAGGAGTTGCTTTCACTGATTTTGCAGACTTGTGTGAGAAGGA
KZ0AAT10YC21FM1 | 361  AGATTGGGCTTCAAAGCAAGGAGTTGCTTTCACTGATTTTGCAGACTTGTGTGAGAAGGA

KZ0ACAA9YA14FM1 | 421  TGAAACTGTTGGCGAGGTCAACGGTCTTCAAAGTGGGAAGGATGCAAACTGGA
KZ0AAT4YP17FM1 | 253  AGAAACTGTCAAGGAAGTACATTCGTCTCTCATTCAGATTGCCAAGAAGTCACGTTTGA
KZ0AAT10YC21FM1 | 421  AGAAACTGTCAAGGAAGTACATTCGTCTCTCTCGTTCAGATTGCCAAGAAGTCACGTTTGA

```

Continua

```

KZ0ACAA9YA14FM1 | 481 CAAGTTTGAAATA CCTGCAAAGATTAAATTGCTGTCA GATCCATGGACACCTGAGTCTGG
KZ0AAT4YP17FM1 | 313 GAAGTTTGAGATTTCCTGCAAAAATCAAATTGCTTTCCTA CTCCTTGGACTCCAGAATCTGG
KZ0AAT10YC21FM1 | 481 GAAGTTTGAGATTTCCTGCAAAAAA AAAAAA-----

KZ0ACAA9YA14FM1 | 541 ATTAAGTTACTGCTGCTCTCAAAATAAAGAGG--GAACAGTTGAAGGCCAAGTTCAAAG--
KZ0AAT4YP17FM1 | 373 CCTTCTCACTGCAGCTCTCAAGATCAAGCGAGAGGCCATTAGAAAAGCTTTCTCTGAAGA
KZ0AAT10YC21FM1 | -----

KZ0ACAA9YA14FM1 | 597 -----A
KZ0AAT4YP17FM1 | 433 CCTGGCTAAGTTATATACGTCATAGTTTCAAGAGGACTTAAGCTTCTACTGGTGACTTTG
KZ0AAT10YC21FM1 | -----

KZ0ACAA9YA14FM1 | 598 CGAACTCCAAAAGTTCTACGAGTAAACATAATGATAAATTATATTCACCATGATATCC
KZ0AAT4YP17FM1 | 493 CCAATCTTGAAGAAATGGAAGACTACTCTCAGATAATATCATCAATCCTACATTTACACAT
KZ0AAT10YC21FM1 | -----

KZ0ACAA9YA14FM1 | 658 TCTTTT TTTTGTGAA-----
KZ0AAT4YP17FM1 | 553 TCCTTGT TTTTGTGTTTAACTATATATTCTTCTTTTAGCTTTA
KZ0AAT10YC21FM1 | -----

```

Concluído

Alinhamento realizado no programa ClustalW das seqüências correspondentes a enzima acil-CoA sintetase B (ACS B)

```

KZ0AAQ6YG15FM1 | 1 TGAGAGGCTTCGAATTTGCAAAAGCTGTGACTTTGGTGCTTGAACCATTACAATGGAAA
KZ0AAS1YJ07RM1 | 1 -----GTGACTTTGGTGCTTGAACCATTACAATGGAAA
KZ0AAP8YI16FM1 | 1 -----

KZ0AAQ6YG15FM1 | 61 ATGGTCTTCTTATCCGACATTTAAGATTAAGAGACCTCAAGCAAGGGAATATTTTCGCAA
KZ0AAS1YJ07RM1 | 35 ATGGTCTTCTTATCCGCAATTTAAGATTAAGAGACCTCAAGCAAGGGAATATTTTCGCAA
KZ0AAP8YI16FM1 | 1 -----

```

Continua



KZ0AAQ6YG15FM1 | 121 **AAGCAATTTCAAACATGTATGCAGAGCTTGCTACATCAGATCCCTCTCCTCAGAAGTAGT**  
 KZ0AAS1YJ07RM1 | 95 **AAGCAATTTCAAACATGTATGCAGAGCTTGCTACATCAGATCCCTCTCCTCAGAAGTAGT**  
 KZ0AAP8YI16FM1 | 1 -----**GCAGAGCTTGCTACATCAGATCCCTCTCCTCAGAAGTAGT**

KZ0AAQ6YG15FM1 | 181 **TGTGAAGGCAATGCAATGAAAAAATATAGAATCCATGACCAAGCACTCCAATGCAGAGA**  
 KZ0AAS1YJ07RM1 | 155 **TGTGAAGGCAATGCAATGAAAAAATATAGAATCCATG**C**CCAAGCACTCCAATGCAGAGA**  
 KZ0AAP8YI16FM1 | 41 **TGTGAAGGCAATGCAATGAAAAAATATAGAATCCATGACCAAGCACTCCAATGCAGAGA**

KZ0AAQ6YG15FM1 | 241 **CGGACTGGCACCACACTACATAATAAGACAGTGAGAGCCTAAAGTTGTCCTGATTTACCAA**  
 KZ0AAS1YJ07RM1 | 215 **CGGACTGGC**C**CCACTACATAATAAG**C**CAGTGAGAGCCTAAAGTTGTCCTGATTTACCAA**  
 KZ0AAP8YI16FM1 | 101 **CGGACTGGCACCACACTACATAATAAGACAGTGAGAGCCTAAAGTTGTCCTGATTTACCAA**

KZ0AAQ6YG15FM1 | 301 **GCCTCCAACATAGT**C**TCATGTATGTTTTTAATCACCTATCTGAAAAATAAAATGGTTGAT**  
 KZ0AAS1YJ07RM1 | 275 **GCCTCCAACATAGTTTTTCATGTATGTTTTTAAT**C**CC**T**TCCTGAAAAATAAAATGGTTGAT**  
 KZ0AAP8YI16FM1 | 161 **GCCTCCAACATAGTTTTTCATGTATGTTTTTAATCACCTATCTGAAAAATAAAATGGTTGAT**

KZ0AAQ6YG15FM1 | 361 **TTTTCTTCTATTTTTCCCTTCAAAGTGAGCATCCCTTCATTCAGCTACTTAACTGTAA**  
 KZ0AAS1YJ07RM1 | 335 **TTTTCTT**T**TATTTTTCCCTTCAAAGTGAGCATCCCTTCATTCAGCTACTTAACTGTAA**  
 KZ0AAP8YI16FM1 | 221 **TTTTCTTCTATTTTTCCCTTCAAAGTGAGCATCCCTTCATTCAGCTACTTAACTGTAA**

KZ0AAQ6YG15FM1 | 421 **TTATTCTCTTCATAAACAGTTGTACACTTAATAAGGAATATAATTTTTATCAGGATCAGG**  
 KZ0AAS1YJ07RM1 | 395 **TTATTCTCTTCATAAACAGTTGTACACTTAATAAGGAATATAATTTTT**T**TCAGGATCAGG**  
 KZ0AAP8YI16FM1 | 281 **TTATTCTCTTCATAAACAGTTGTACACTTAATAAGGAATATAATTTTTATCAGGATCAGG**

KZ0AAQ6YG15FM1 | 481 **G**-----**GACAAAAAAAAAAAAAAAAA**-  
 KZ0AAS1YJ07RM1 | 455 **G**-----**GCAAAAAAAAAAAAAAAAA**  
 KZ0AAP8YI16FM1 | 341 **G**GACAATAGGATTGAG**T****C**AAAAAAAAAAAAAAAAA

Concluído