



IDENTIFICAÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO TRANSCRICIONAL DAS DESIDRINAS DE MACIEIRA

YOHANNA EVELYN MIOTTO¹; VÍTOR DA SILVEIRA FALAVIGNA²; DIOGO DENARDI
PORTO³; MÁRCIA MARGIS-PINHEIRO⁴; GIANCARLO PASQUALI⁵; LUÍS FERNANDO
REVERS⁶

INTRODUÇÃO

Em um estudo de expressão gênica diferencial realizado anteriormente pelo grupo, a técnica de Hibridização Supressiva Subtrativa foi utilizada na identificação de genes potencialmente envolvidos na dormência de gemas em macieira. Duas cultivares contrastantes quanto ao requerimento de frio foram utilizadas na construção de quatro bibliotecas subtrativas recíprocas na entrada e superação da dormência. Gemas da cultivar de maior requerimento apresentaram grande número de transcritos relacionados à resposta a estresses, tais como os codificadores de desidrinas.

As desidrinas (DHN, do inglês, *dehydrin*) possuem expressão induzida por sinais de desidratação celular como frio, salinidade e seca, protegendo membranas lipídicas celulares e conferindo atividade crioprotetora a enzimas. Estudos demonstraram correlação entre o seu acúmulo e a máxima tolerância ao frio. Caracterizam-se pela presença de um domínio conservado (segmento K) presente em uma ou mais cópias perto da região carboxi-terminal. Outras sequências conservadas (segmento Y e S) podem estar presentes. Sua classificação baseia-se no número de repetições desses segmentos (RORAT, 2006).

A compreensão dos mecanismos que possibilitam que plantas superem condições ambientais adversas é de grande importância para a manutenção e ampliação de culturas vegetais de interesse agrônomo. O presente estudo visa identificar e classificar genes codificadores de DHNs de macieira, bem como realizar a caracterização destes por meio de RT-qPCR.

MATERIAL E MÉTODOS

A sequência consenso para o segmento K das DHNs serviu de isca em buscas por BLAST nos genomas de macieira e pessegueiro. O critério de seleção utilizado foi um *bit score* maior que 30 e 27, respectivamente. Três acessos de pêsego já haviam sido previamente caracterizados. Os

¹ Eng. Bio. Bio., estudante de graduação UERGS, e-mail: yohanna.miotto@gmail.com

² Eng. Bio. Bio., estudante de pós-graduação, PPGBCM/UFRGS, e-mail: vitorfalavigna@gmail.com

³ Biólogo, bolsista CNPq, Embrapa Uva e Vinho-RS, e-mail: diogodp@cnpuv.embrapa.br

⁴ Bióloga, professora UFRGS, e-mail: marcia.margis@ufrgs.br

⁵ Farmacêutico, professor UFRGS, e-mail: pasquali@cbiot.ufrgs.br

⁶ Biólogo, pesquisador Embrapa Uva e Vinho-RS, e-mail: luis@cnpuv.embrapa.br

acessos da planta modelo *Arabidopsis* foram obtidos a partir do trabalho de Bassett et al. (2009).

As sequências proteicas deduzidas dos 24 genes identificados foram submetidas à análise de domínios no programa *MEME Suite* v.4.8.1 (BAILEY et al. 1994). Parâmetros padrões foram utilizados, exceto o número máximo de motivos, definido para 10; o tamanho de cada motivo, definido entre oito e 25 aminoácidos; e o número mínimo de acessos, definido para sete.

As sequências peptídicas completas das DHNs foram alinhadas com o *software MUSCLE* (EDGAR, 2004). Uma árvore filogenética foi construída utilizando-se a inferência Bayesiana por meio do *software Mr. Bayes* 3.1.2 (HUELSENBECK et al. 2001). O tipo de substituição utilizado foi o misto, com 5.000.000 de gerações amostradas a cada 100, sendo as primeiras 250 árvores descartadas. As árvores restantes foram utilizadas para construir a árvore consenso.

Com base no genoma, 1000 nucleotídeos anteriores ao códon de início de tradução de cada uma das *MdDHNs* foram utilizados para a caracterização da região promotora. A análise de elementos *cis* foi realizada por meio do banco de dados PLACE (HIGO et al., 1999), buscando a identificação de elementos responsivos ao frio, desidratação e ácido abscísico (ABA).

Para a caracterização transcricional, oito amostragens de gemas fechadas de ‘Fuji Standard’ foram realizadas durante o ano de 2009 em um pomar da Estação Experimental da EPAGRI em Caçador (SC). O protocolo modificado de Zeng et al. (2002) foi utilizado para a extração de RNA total. A contaminação por DNA foi eliminada pelo tratamento com DNase (Ambion) e os cDNAs foram sintetizados utilizando-se o *kit GeneAmp* (Applied Biosystems). Pares de *primers* específicos para *MdDHNs* foram projetados com os programas *Primer3* v.0.4.0 e *OligoAnalyzer* IDT. RT-qPCRs foram realizadas no aparelho *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) utilizando-se quantificação por fluorescência de *SYBR-Green* (1:100). Cada amostra biológica (n=3) foi analisada em quadruplicata técnica. A amplificação consistiu em um *hot start* da enzima por 10’ a 95°C, seguido de 40 ciclos de (1) desnaturação a 95°C por 15’’ e (2) 60’’ a 60°C para anelamento dos *primers* e extensão das fitas. Ao final, foi realizada a curva de dissociação entre as temperaturas de 60 e 95°C. A especificidade dos *primers* foi avaliada pela presença de pico único na curva de dissociação e banda única em gel de eletroforese. A expressão relativa foi calculada pelo método de Pfaffl (2001) em função dos genes referência *ARC5*, *MDH* e *WD40* (PERINI et al., dados não publicados) e relativizada para fevereiro de 2010.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca do segmento K permite identificar DHNs em diferentes organismos por BLAST. Identificamos oito membros em macieira (*MdDHN2* a 9), número condizente com outras espécies como *Arabidopsis* (com dez), pêssigo (com seis), arroz e álamo (com nove; Bassett et al., 2010).

A construção de um cladograma por meio de inferências bayesianas permitiu a busca de homologias entre as sequências analisadas. Observou-se a formação de ortólogos e parálogos entre

os acessos *MdDHN2* e *MdDHN5*; *MdDHN3* e *PpDHN2*; *MdDHN4* e *MdDHN7* com *PpDHN3*; *MdDHN6* e *PpDHN1*; e *MdDHN8* e *MdDHN9* (Figura 1). A maior similaridade entre sequências de macieira e pessegueiro pode ser explicada pelo fato de ambas pertencerem à família das Rosáceas, estando evolutivamente mais próximas entre si do que a *Arabidopsis*.

A análise de domínios proteicos revelou a existência de diversos motivos conservados entre as sequências analisadas, os quais puderam ser relacionados com os segmentos já descritos. A classificação dos *MdDHNs* foi realizada em função dos segmentos identificados (Figura 1). Entretanto, motivos ainda não descritos foram observados e demandam maiores estudos.

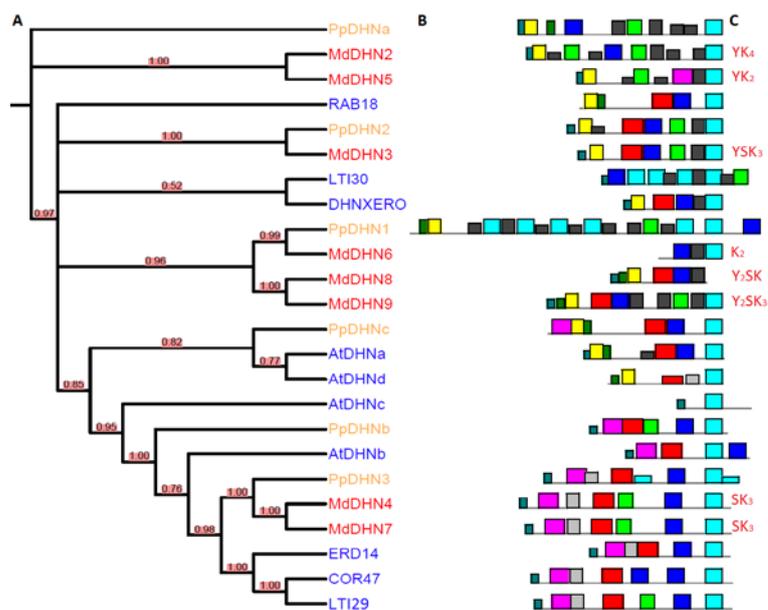


Figura 1 – Cladograma filogenético (A) e representação dos domínios de DHNs (B). Segmento K representado em azul claro, azul e verde claro; segmento Y em amarelo e verde escuro; segmento S em vermelho. Na coluna "C" está a classificação das *MdDHNs* quanto aos seus segmentos.

Elementos *cis* responsivos ao frio, desidratação e ABA regulam a expressão de genes *DHNs* em diversas plantas (BASSETT et al., 2009). A busca de tais elementos foi realizada nos genes de macieira. Os genes *MdDHN2*, 5 e 8 possuem sítios responsivos ao ABA (ABRE). O gene *MdDHN3* possui elementos responsivos à desidratação (MYC e DRE), perfil consistente com seu ortólogo *PpDHN2*. Os genes *MdDHN4*, 6, 7 e 9 apresentaram elementos responsivos ao frio (CRT e ICEr2), mesmo perfil observado nos correspondentes ortólogos em pêssigo (BASSETT et al., 2009).

O perfil transcricional obtido em gemas de macieira amostradas durante um ciclo anual de 'Fuji Standard' permitiu identificar um padrão similar de expressão entre os genes analisados. Observou-se um pico de concentração de transcritos no inverno para as oito *DHNs* de macieira (Figura 2). A presença de diferentes elementos *cis* não resultou em perfis diferenciais de expressão, sugerindo a existência de mecanismos complementares de regulação gênica. A menor e maior variação de expressão foi observada para os genes *MdDHN7* e 9, respectivamente.

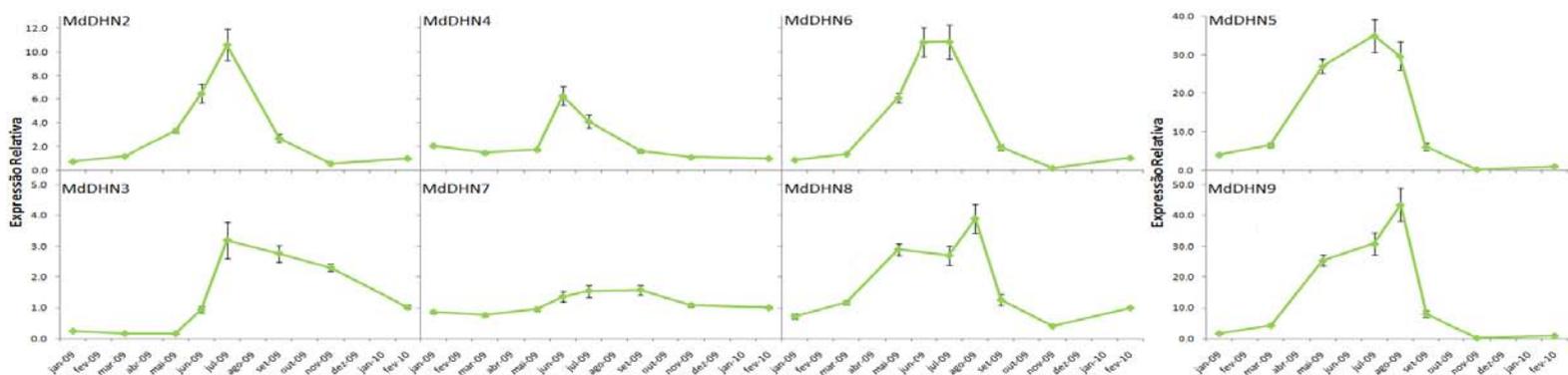


Figura 2 – Análise do perfil transcricional por RT-qPCR dos potenciais *MdDHNs*.

CONCLUSÕES

Foram identificados oito potenciais *DHNs* em macieira, as quais foram classificadas conforme os segmentos apresentados. A análise da provável região promotora dos genes revelou elementos responsivos ao frio, à desidratação e ao ABA. Os oito genes exibiram perfil sazonal de regulação da expressão em gemas de macieira. Esta é a primeira etapa de estudos voltados para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares de superação de condições ambientais adversas.

REFERÊNCIAS

- BAILEY, T.L.; ELKAN, C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. **Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol**, v.2, p.28–36, 1994.
- BASSETT, C.L. et al. Comparative expression and transcript initiation of three peach dehydrin genes. **Planta**, v.230, p.107–118, 2009.
- BASSETT, C.L., DARDICK, C.D., GASIC, K., FISHER, K. The peach dehydrin family is small relative to all other sequenced plant genomes. **Amer. Soc of Hort Sci Meeting**, 2010.
- EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res**, V.32, P.1792-1797, 2004.
- HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWAMOTO, M.; KORENAGA, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. **Nucleic Acids Res**, V.27, P.297–300, 1999.
- HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, v.17, p.754-755, 2001.
- PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v.29, n.9, p.2002-2007, 2001.
- RORAT, T. Plant Dehydrins – tissue location, structure and function. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.11, p.536-556, 2006.
- ZENG, Y.; YANG, T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Mol Biol**, v.20, p.417a-417e, 2002.