

**ISOLAMENTO DE UM FRAGMENTO GENÔMICO DO PROVÁVEL ORTÓLOGO DO
GENE *IDI* EM CANA DE AÇÚCAR**

CARLA PRISCILA COELHO¹, ANTÔNIO CHALFUN JUNIOR²; JOSEPH COLASANTI³,
SOLANGE APARECIDA SÁGIO⁴

RESUMO

O processo de florescimento em monocotiledôneas compartilha a maior parte da complexa rede caracterizada em eudicotiledôneas. Contudo, alguns mecanismos do processo de regulação, que é explicado pelo modelo molecular ABCE, são divergentes nos dois grupos. Monocotiledôneas apresentam páleas e lemas, ao invés de sépalas e pétalas. Sugere-se que genes específicos em monocotiledôneas podem estar envolvidos no controle do processo de florescimento. O gene *IDI* é um gene do florescimento caracterizado em milho, expresso somente em folhas imaturas, indicando que esse gene desempenha um papel na sinalização a longa distância para desencadear o florescimento. O objetivo deste trabalho foi isolar, clonar e sequenciar o possível gene *ScIDI*, comparando-o com o gene *IDI*. Os resultados da reação de amplificação com o DNA genômico de cana de açúcar permitiu o isolamento de parte do provável gene *ScIDI*.

Palavras-chaves: gene, *IDI*, *ScIDI*, florescimento, comparação filogenética

INTRODUÇÃO

O gene *IDI* determina a mudança do estado vegetativo para o reprodutivo em milho, e esse gene tem sido identificado em espécies relacionadas como sorgo e arroz. Apesar da cana de açúcar ter sido extensivamente estudada (GUIMARÃES et al., 1997; FIGUEIREDO et al., 2001; PAPINITERZI, 2009; CASU et al., 2005; CALSA JÚNIOR; JUNQUEIRA, 2007; MOORE, 2005), nenhum estudo relacionado ao processo de florescimento e genes específicos dessa rede complexa tem sido reportado. O processo de florescimento em cana de açúcar é de fundamental importância, como para todas as plantas superiores, mas especialmente nessa cultura, a transição do florescimento é seguida pelo processo de isoporização. Esse processo é definido como a desidratação dos tecidos dos colmos, seguida pelo decréscimo do suco da cana, resultando em uma alta quantidade de fibras (CAPUTO et al., 2007). A isoporização leva ao decréscimo no rendimento do açúcar nos colmos, devido à translocação de assimilados do carbono para produção de sementes. Uma vez que o gene do florescimento *IDI* foi caracterizado em milho, a caracterização inicial deste gene em cana de açúcar é de suma importância, pois milho e cana de açúcar são espécies intimamente relacionadas. O objetivo deste trabalho foi isolar, clonar e comparar o provável gene ortólogo de *IDI* em cana de açúcar com o de milho.

¹ Doutoranda em Fisiologia Vegetal, DBI/UFLA, carllapc@posgrad.ufla.br

² Professor Adjunto, DBI/UFLA, chalfunjunior@dbi.ufla.br

³ Professor Assistente, Department of Molecular and Cellular Biology/University of Guelph, jcolasan@uoguelph.ca

⁴ Doutoranda em Fisiologia Vegetal, DBI/UFLA, solsagio@gmail.com.br

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Os experimentos foram desenvolvidos no Departamento de Biologia Molecular e Celular da Universidade de Guelph, Canadá. A variedade RB72 454 de cana de açúcar foi fornecida pelo professor Antônio Paulino da Costa Netto, coletada no campo de experimental da Universidade do Estado de Minas Gerais, em Passos, Brasil. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento no Phytotron da Universidade de Guelph sob as seguintes condições: 80% de umidade, 1000 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa e 28 °C.

Extração e purificação do DNA genômico de cana de açúcar

Folhas da variedade RB72 454 foram coletadas e utilizadas para a extração de DNA genômico. Os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e pulverizados em tubos de microcentrífuga. Foram adicionados 750 μl de tampão de extração e 50 μl 10 % de SDS e os tubos foram agitados vigorosamente. Tubos, contendo os extratos, foram incubados a 65 °C por 10 minutos, centrifugados a máxima velocidade (14.000 $\times g$) por 5 min. O sobrenadante foi transferido para microtubos de 1.5 mL contendo 250 μl de 5M de acetato de potássio, agitados por inversão e incubados em gelo por 20 min. Após esse processo, eles foram centrifugados a máxima temperatura por 5 minutos e o sobrenadante transferido para tubos contendo 500 μl de isopropanol, misturados e incubados a -20°C por 20 min. Logo após, as soluções foram centrifugadas a temperatura máxima por 15 minutos, o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 300 μl de 70% etanol. O sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspensionado em 50-100 μl de água. Após isso, as amostras foram tratadas com RNase I, *E. coli* (Fermentas Life Sciences) e incubadas por 60 minutos a 37°. O DNA genômico de cana de açúcar foi quantificado.

Amplificação de possíveis sequências *ID1* por PCR com primers degenerados

Seis pares de primers degenerados foram desenhados baseados na sequência do gene *ID1* de milho (Colasanti et al., 2006) e utilizados para amplificar possíveis sequências ortólogas do gene *ID1* de cana de açúcar. As sequências de primers foram as seguintes: c1scF (5' ATGATGATGYTNWSNGAYYT 3'), c1scR (5' RAARTTRTGNSWCCANGTYTC 3'), c2scF (5' ATGCARCARCCNWSNCC 3'), c2scR (5' CCANGTYTCRTTNACNGGNGG 3'), c3scF (5' WSNCCNTTYCTNCARCCNMG 3'), c3scR (5' YTGNGAGYTCYTCNACYTGNC 3'), c4scF (5' GGNGGNGAYATGGCNWSNTA 3'), c4scR (5' YTGRTCNCYKYGRAANCCYTT 3'), c5scF (5' GAYTGGAARGCNCAYGTNAA 3'), c5scR (5' YTCYTGRTGNAGRAARAANAG 3'), c6scF (5' AARAGRAARAGRWSNCARCCG 3') e c6scR (5' RAARTGYTTYTTDATNCCNGT 3').

Clonagem e transformação dos produtos da amplificação

Antes da clonagem, extremidades abruptas foram formadas com T4 DNA polimerase (Fermentas), de acordo com as instruções do produto. A 1 μL de DNA foi adicionado 2 μL de 10X de O buffer, um mix de dNTP e T4 DNA polimerase. O mastermix foi agitado vigorosamente, e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. A reação foi paralisada por aquecimento a 75 °C por 10 min.

O DNA com extremidades abruptas foi ligado ao vetor pCR-Blunt II-TOPO, utilizando-se Zero Blunt Cloning kit (Invitrogen®).

Transformação química de células competentes de *E. coli*

Vetores recombinantes foram inseridos em *E. coli*, estirpe DH5 α , quimicamente competentes (Invitrogen®) em meio suplementado com Kan50. Foram misturados 2 μL dos produtos da ligação a 40 μL de *E. coli*, incubados em gelo por 30 minutos, seguido de choque térmico a 42°C por 45 segundos, e incubados novamente em gelo por 2 minutos. Foram adicionados 250 μL de meio SOC (Invitrogen®) foram adicionados às células recombinantes. Incubados em *shaker* (300 rpm) a 37 °C por 45 minutos. Após isso, as células foram plaqueadas em meio LB sólido enriquecido com 50 $\mu\text{L/mL}$ de canamicina (Kan50), e deixado por 16 horas a 37 °C.

Extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído das colônias transformadas usando o kit Plasmid Miniprep (Qiagen). Uma colônia contendo o gene foi adicionada a 10 mL de meio LB suplementado com Kan50 e mantidos em agitador orbital a 200 rpm, 37 °C por 16 horas. Logo após, as colônias foram centrifugadas, para precipitar as células, e utilizadas para a extração do DNA plasmidial.

Sequenciamento do DNA

Os clones selecionados foram sequenciados utilizando ABI PRISM 3100 genetic analyser (Applied Biosystems) no Centro de Genômica do Science complex, na Universidade de Guelph. Primers M13 reverse e M13 forward foram usados para gerar as sequências.

Alinhamento das sequências do gene *IDI* de cana de açúcar

As sequências de cana de açúcar foram alinhadas com as de sorgo, milho e arroz utilizando-se o software *CLC Main Workbench 5.1*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sequência traduzida *in silico* foi analisada para verificar a presença de domínios conservados que ajudassem na caracterização do possível gene, se ela continha o domínio conservado. O fragmento genômico apresentou um íntron pequeno contendo o dedo de zinco 1, quando comparado com a sequência traduzida do gene *IDI* de milho, que apresenta uma região intrônica de 89 pb na mesma posição (Figura 1). Apesar dos dados indicarem que essa região compreende um íntron como o do *IDI*, cDNAs de cana de açúcar necessitam ser sequenciados para confirmar a posição correta e caracterizar a região intrônica de cana de açúcar.



Figura 1- Alinhamento da sequência traduzida de cana de açúcar (c4scF/c4scR amplicon) com a região respectiva do gene *ID* de milho. Na caixa preta está destacada a possível sequência intrônica do *ScIDI* comparada à região intrônica do *IDI* de milho.

A sequência traduzida foi alinhada com as sequências de *IDI* de milho e *SbIDI* (sorgo) (Figura 2). A região sequenciada inclui o dedo de zinco 1 envolvendo um peptídeo sinal (NLS) KRKR, que marca o início do domínio ID (COLASANTI et al., 2006).

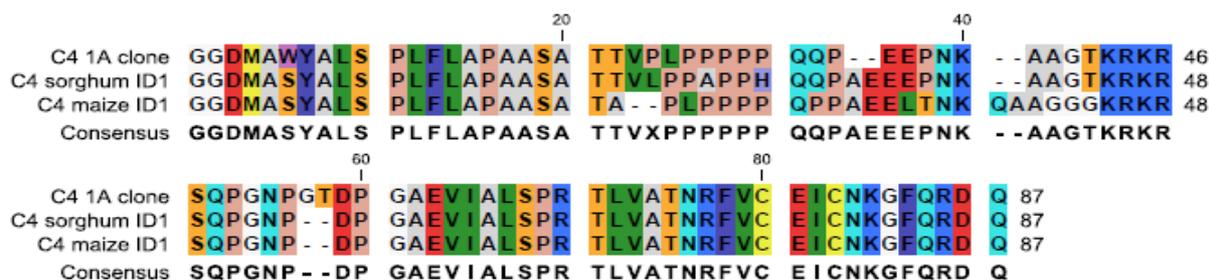


Figura 2 – Alinhamento do amplicon c4scF/c4scR (C4 1A clone) às respectivas regiões codantes dos genes *ID1* e *SbID1*.

Pelos resultados pode-se inferir que a sequência isolada pode ser parte de um gene ortólogo do *ID1* porque apresenta um dos domínios conservados deste gene. Apesar de análises funcionais não terem sido feitas para verificar se o gene *ScID1* desempenha um papel no florescimento de cana de açúcar, um gene ortólogo pode ser identificado por reconstruções filogenéticas baseadas em domínios conservados de proteínas (Nardmann; Werr, 2007). Baseado nesses fatos, a possível função conservada necessita ser confirmada por padrão de expressão gênica ou análises de mutantes. Consequentemente, será possível confirmar se o provável gene *ScID1* atua como um gene do florescimento em cana de açúcar.

CONCLUSÃO

A alta similaridade do gene *ScID1* com parte da sequência traduzida do gene *ID1* sugere que a cana de açúcar possivelmente possui um ortólogo do gene *ID1* de milho.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

- CALSA JÚNIOR, T.; JUNQUEIRA, A. Serial analysis of gene expression in sugarcane (*Saccharum spp.*) leaves revealed alternative C4 metabolism and putative antisense transcripts. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 63, n. 10, p. 745-762, Apr. 2007.
- CAPUTO, M. M.; SILVA, M. A.; BEAUCLAIR, E. G. F.; GAVA, G. J. C. Acúmulo de sacarose, produtividade e florescimento de cana de açúcar sob reguladores vegetais. **Interciencia**, Venezuela, v. 32, p. 834-839, dic. 2007.
- CASU, R. E.; MANNERS, J. M.; BONNETT, G. D.; JACKSON, P. A.; MCINTYRE, C. L.; DUNNE, R.; CHAPMAN, S. C.; RAE, A. L.; GROF, C. P. L. Genomics approaches for the identification of genes determining important traits in sugarcane. **Field Crops Research**, Netherlands, v. 92, p. 137-147, June 2005.
- COLASANTI, J.; TREMBLAY, R.; WONG, A. Y.; CONEVA, V.; KOZAKI, A.; MABLE, B. K. The maize *Indeterminate1* flowering time regulator defines a highly conserved zinc finger protein family in higher plants. **BMC Genomics**, London, v. 7, p. 158-175, June 2006.
- FIGUEIREDO, R. C.; BRITO, M. S.; FIGUEIREDO, L. H. M.; QUIAPIN, A. C.; VITORELLI, P. M.; SILVA, L. R.; SANTOS, R. V.; MOLFETTA, J. B.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H. S. Dissecting the sugarcane expressed sequence tag (SUCEST) database: unravelling flower-specific genes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 1/4, p. 77-84, 2001.

GUIMARÃES, C. T.; SILLS, G. R.; SOBRAL, B. W. S. Comparative mapping of Andropogonae: Saccharum L. (sugarcane) and its relation to sorghum and maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 14261-14266, Dec. 1997.

MOORE, P. H. Integration of sucrose accumulation processes across hierarchical scales: towards developing an understanding of the gene-to-crop continuum. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 92, p. 119-135, June 2005.

NARDMANN, J.; WERR, W. The evolution of plant regulatory networks: what *Arabidopsis* cannot say for itself. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10, p. 653-659, Aug. 2007.

PAPINI-TERZI, F. S. Sugarcane genes associated with sucrose content. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 120-141, Mar. 2009.