

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

CARLA PRISCILA COELHO<sup>1</sup>, ANTÔNIO CHALFUN JUNIOR<sup>2</sup>; JOSEPH COLASANTI<sup>3</sup>,  
SOLANGE APARECIDA SÁGIO<sup>4</sup>

**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.

---

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

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

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

<sup>4</sup> 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  $\mu\text{l}$  de tampão de extração e 50  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  de 70% etanol. O sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspensionado em 50-100  $\mu\text{l}$  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 *IDI* por PCR com primers degenerados**

Seis pares de primers degenerados foram desenhados baseados na sequência do gene *IDI* de milho (Colasanti et al., 2006) e utilizados para amplificar possíveis sequências ortólogas do gene *IDI* 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' YTGNAAGYTCYTCNACYTGNC 3'), c4scF (5' GGNGGNGAYATGGCNWSNTA 3'), c4scR (5' YTGRTCNCYKTYGRAANCCYTT 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 $\mu\text{L}$  de DNA foi adicionado 2 $\mu\text{L}$  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 $\alpha$ , quimicamente competentes (Invitrogen®) em meio suplementado com Kan50. Foram misturados 2  $\mu\text{L}$  dos produtos da ligação a 40  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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.





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.