



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:  
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

# FEPEG

F Ó R U M  
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

## ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DA EXPRESSÃO DO GENE PSBA COMO MARCADOR ESTÁDIO-ESPECÍFICO EM ESPÉCIES FRUTÍFERAS DO CERRADO

**Autores:** LUANA CRISTINA DINIZ SANTOS, MARCIO ANTONIO PIMENTA, SÔNIA RIBEIRO ARRUDAS, GUILHERME ARAÚJO LACERDA

### Introdução

A identificação e utilização de marcadores estádios-específicos permite uma melhor compreensão dos aspectos básicos dos processos de desenvolvimento vegetal além de propiciar a possibilidade de otimização de sistemas e protocolos de morfogenéticos *in vitro* para fins aplicados e biotecnológicos. A utilização de marcadores bioquímicos, como poliaminas (substâncias liberadas em estresses), hormônios vegetais, proteínas e óxido nítrico (radical livre), em conjunto na expressão de genes marcadores, pode representar uma importante estratégia para a otimização e o controle dos processos morfogenéticos *in vitro* (FLOH *et al.*, 2007). Adicionalmente, o uso desses marcadores pode ser crucial para estudos básicos em biologia celular, bioquímica e fisiologia vegetal, utilizando sistemas de cultura de tecidos de plantas. Esta estratégia pode ser importante para a viabilização da cultura de tecidos na propagação de genótipos superiores e na conservação de germoplasma, assim como sua utilização como ferramenta complementar em programas de melhoramento genético, que utilizam técnicas biotecnológicas, como a transformação genética, para aumentar o ganho genético. Sabe-se que, geralmente, as espécies frutíferas nativas do cerrado não têm estudos aprofundados como acontece, por exemplo, com as frutas agrônomicas comerciais. As frutíferas do cerrado não apresentam uniformidade do fruto entre as plantas. Agregados celulares de espécies frutíferas do cerrado, com competência à embriogênese, foram associados à expressão do gene *psbA* de família multigenica em que são complexos proteicos envolvidos no processo de fotossistema II (GARCZAREK *et al.*, 2008). Ficou evidenciado que, para este sistema, é possível utilizar a expressão do gene *psbA* como um marcador para o reconhecimento das células competentes para o desenvolvimento.

### Material e métodos

#### Identificação de sequências para o gene *psbA*

As sequências identificadas como *psbA* foram obtidas a partir do banco de dados públicos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) no período entre janeiro e junho de 2018. Por meio desta interface foi possível procurar por sequências, montar *clusters* e analisar (LACERDA *et al.*, 2008) os prováveis genes candidatos para *psbA*. Primeiramente, realizou-se uma busca por palavras-chave, no caso *psbA*, sendo o objetivo as espécies frutíferas do cerrado, tendo que inicialmente todas as sequências tenham sido previamente anotadas automaticamente por comparação com o próprio banco de dados. Dessa forma, as sequências encontradas foram então agrupadas em *clusters* e em seguida foram submetidas à anotação manual. Todas as sequências identificadas como *psbA* após a anotação, foram utilizadas para uma nova busca afim de obter uma otimização da saturação do banco de dados, utilizando-se a ferramenta BLASTn, visando encontrar novas sequências de genes para *psbA*, bem como corrigir *clusters* incompletos.

#### Análise filogenética

O alinhamento entre as sequências obtidas a partir do banco de dados para o gene *psbA* foi executada pelo programa *ClustalW* (THOMPSON *et al.*, 1994) com os parâmetros padrões (*default*) e se utilizando as sequências nucleotídicas. A árvore filogenética foi construída através do programa MEGA na versão 4.0 que contém a opção (*timetrees*) que permite a construção de árvores evolutivas em escala de tempo, que são claramente necessárias pelos cientistas, uma vez que um número crescente de estudos está relatando tempos de divergência para espécies, cepas e genes duplicados (TAMURA *et al.*, 2013), com o modelo de comparação *Neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987), método de *maximum composite likelihood* e supressão *pair-wise*. A validade da árvore quanto à distância filogenética dos *clusters* foi aferida pelo teste probabilístico de *bootstraps* (SITNIKOVA *et al.*, 1995).

### Resultados e discussão

Ao final do processo alcançou 59 sequências nucleotídicas do gene *psbA* sendo a maioria das espécies frutíferas do cerrado: Barbatimão (*Stryphnodendron* Mart.), Buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.), Cagaita (*Eugenia Dypenterica* (Mart.) DC.), Cajuzinho (*Brysonima intermedia* A.Juss.), Guaçatonga (*Casearia Syvestris* Sw.), Jenipapo (*Genipa Americana* L.), Joá-bravo (*Solanum viarum* Dunal), Pau-terra (*Qualea grandiflora* Mart.); Pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.) e apenas uma espécie cultivada Tamarindo (*Tamarindus indica* L.). Verificando as sequências nucleotídicas na figura 1, observasse três grupos externos (*outgroups*) do gene *psbA* que é relacionado ao grupo interno (*ingroup*). A espécie Tamarindo (*Tamarindus indica* L.) entre as sequências quatro e cinco foram as que demonstraram maior divergência genética na árvore, pois se ramificaram em diversos pontos, sendo assim identificadas. Os três grupos do gene *psbA* foram analisados pelo método *bootstrap* na árvore consenso com 500 replicas em que foram gerados testes para verificar a confiança nos ramos. De acordo com literaturas científicas o gene *psbA* codifica o polipeptídeo D1 do gene fotossistema dois da fotossíntese em plantas (METZ *et al.*, 1990), sendo assim um gene que pode ajudar a fotossíntese através das proteínas codificadoras. Os estudos com o gene *psbA* ainda são pequenos diante a vasta informação sobre os processos embriogênicos que potencialmente ele pode ser um grande fator.



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:  
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

# FEPEG

F Ó R U M  
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

## Considerações finais

Analisando-se as relações filogenéticas entre as sequências analisadas observam-se os grupos iniciais com agrupamentos internos (*ingroup*) caracterizados por transformações, principalmente na espécie Tamarindo (*Tamarindus indica* L.) o gene *psbA* sendo uma família multigênica envolvida nos processos de fotossíntese ainda são trabalhos sendo incipientes. Logo, estudos que envolvem marcadores estádio-específico otimizaram a propagação clonal e uniforme de plantas de espécie frutíferas do cerrado, embasando sua futura utilização para fins de melhoramento genético.

## Agradecimentos

Ao Laboratório de Bioinformática e Bioprodutos (LaBio) e ao apoio logístico na implementação e execução do projeto e a FAPEMIG pela concessão de bolsa de Iniciação Científica.

## Referências bibliográficas

- FLOH, E. I. S.; *et al.* Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese in vitro. **Rev. Bras. Hort. Orn.**, Campinas, v. 13, p. 1992-2001, 2007.
- GARCZAREK, L.; *et al.* Function and Evolution of the *psbA* gene family in marine *Synechococcus*: *Synechococcus* sp. WH7803 as a case study. **The isme journal** v 2, p. 937-953, 2008
- LACERDA, G. A. *et al.* Expressão *in silico* de genes candidatos para SERK (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*) em *Coffea arabica* L. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA. 17. p. 322-327. 2008. **Anais...** Lavras: UFLA, 2008.
- METZ, J. *et al.* Nucleotide sequence of the *psbA3* gene from the cyanobacterium *Synechocystis* P00 6803. **Nucleic Acids Research**, Vol. 18, No. 22 6715 1990
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 13 Set 2018.
- SAITOU, N.; NEL, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** Oxford, v.4, p.406-425, 1987.
- SITNIKOVA, T. *et al.* Interior-branch and bootstrap tests of phylogenetics trees. **Mol. Biol. Evol.**, Oxford, v. 12, p. 319-33, 1995.
- TAMURA, K. *et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Versão 6.0. **Mol. Biol. Evol.**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 2725-2729. 2013.
- THOMPSON, J. D. *et al.* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Ac. Res.**, Oxford, v.22, p.4673-4680, 1994.



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:  
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

# FEPEG

F Ó R U M  
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

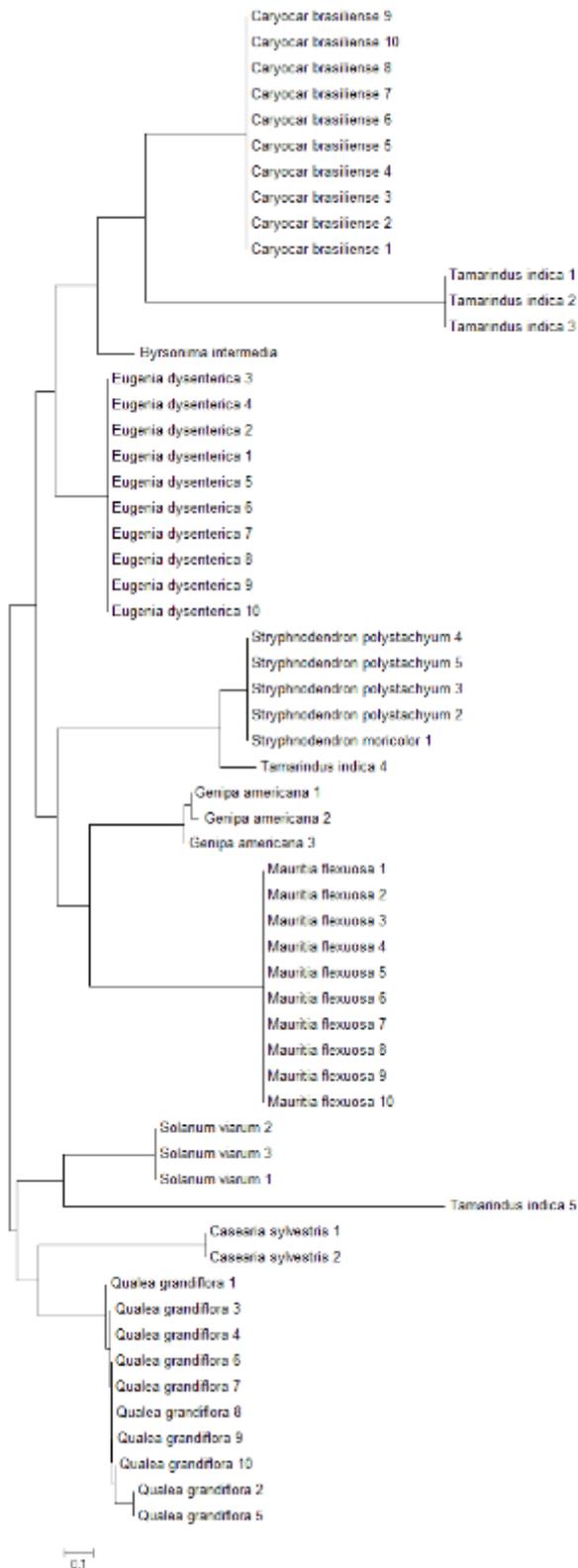
REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X



**Figura 1.** Árvore consenso gerada na análise *bootstrap*, método de Agrupamento de Vizinhos (NJ) demonstrando relações filogenéticas para sequências de psbA em escala de tempo pelo método (*timetrees*) entre as espécies frutíferas do cerrado: Barbatimão (*Stryphnodendron* Mart.), Buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.), Cagaita (*Eugenia dysenterica* (Mart.) DC.), Cajuzinho (*Brysonima intermedia* A.Juss.), Guaçatonga (*Casearia sylvestris* Sw.), Jenipapo (*Genipa americana* L.), Joá-bravo (*Solanum viarum* Dunal), Pau-terra (*Qualea grandiflora* Mart.), Pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.) e a espécie cultivada Tamarindo (*Tamarindus indica* L.).



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:  
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

# FEPEG

F Ó R U M  
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X