

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO
RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

Autor(es): GUILHERME ARAÚJO LACERDA, LUANA CRISTINA DINIZ SANTOS, MÁRCIO ANTÔNIO SILVA PIMENTA

Agrupamento de sequencias nucleotídicas para *SERK* como marcador estádio-específico em espécies de importância agrônômica

Resumo

O reconhecimento e a aplicação de marcadores estádios-específicos permite uma melhor percepção a aspectos do processo de desenvolvimento vegetal, assim assentindo que seja uma ferramenta complementar em programas de melhoramento genético. Realizou-se uma busca pela palavra-chave *SERK*, que através da mesma, se obteve 37 sequencias nucleotídicas. Para conseguir identificar e analisar as sequencias de gene, foi realizada a análise filogenética através do programa MEGA 4, com modelo de comparação *neighbor-joining*, método *p-distance* e supressão *pair-wise*. Analisando-se as relações filogenéticas entre as sequencias analisadas observam-se dois grupos iniciais com agrupamentos internos, onde o topo da árvore demonstra ocorrência de *SERK1* e *SERK2* que aparecem também como um grupo mais externo.

Palavras-chave: *Somatic embryogenesis-related kinase*; *KINASE1*; *BR11-Associated Receptor Kinase1*.

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. Agregados celulares de espécies agronomicamente cultivadas, com competência à embriogênese, foram associados à expressão do gene *Somatic Embryogenic Receptor-Like Kinase* (*SERK*) e com perfis específicos de poliaminas (PAs) e aminoácidos associados a síntese de PAs (SANTA-CATARINA *et al.*, 2004). Ficou evidenciado que, para este sistema, é possível utilizar a expressão do gene *SERK* como um marcador para o reconhecimento das células competentes.

Material e métodos

Identificação de sequencias para o gene *SERK*

As sequencias identificadas como *SERK* foram obtidas a partir do banco de dados públicos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) no período entre maio e novembro de 2016. Por meio desta interface foi possível procurar por sequencias, montar clusters e analisar os prováveis genes candidatos para *SERK* (LACERDA *et al.*, 2008). Inicialmente, realizou-se uma busca por palavras-chave, no caso *SERK*, tendo em vista que todos as sequencias tenham sido previamente anotados automaticamente por comparação com o próprio banco de dados. Dessa forma, as sequencias encontrados foram então agrupadas em clusters e em seguida foram submetidas à anotação manual. Todas as sequencias identificados como *SERK* 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 *SERK*, bem como corrigir clusters incompletos. Esse processo, também chamado de saturação, foi repetido até que não se encontrem mais nenhuma nova sequência significativa.

Análise filogenética

O alinhamento entre as sequencias obtidas a partir do banco de dado para o gene *SERK* foi executada pelo programa *ClustalW* (THOMPSON *et al.*, 1994) com os parâmetros padrões (*default*) e utilizando-se as sequencias nucleotídicas. A árvore filogenética foi construída através do programa MEGA 4 (TAMURA *et al.*, 2007), com o



modelo de comparação *Neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987), método de *p-distance* 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 obteve-se 37 sequências nucleotídicas relacionadas a *SERK1*, 2 e 3 em espécies agronomicamente importantes como: algodão (*Gossypium hirsutum*), videira (*Vitis vinifera*), abacaxi (*Ananas comosus*), arroz (*Oryza sativa*), café (*Coffea canephora*), alface (*Lactuca sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), milho (*Zea mays*), soja (*Glycine max*), cacau (*Theobroma cacao*), cenoura (*Daucus carota*) e batata-inglesa (*Solanum tuberosum*). Analisando-se as relações filogenéticas entre as sequências citadas (Figura 1), observam-se dois grupos iniciais com agrupamentos internos, onde o topo da árvore demonstra ocorrência de *SERK1* e *SERK2* aparecendo em um grupo mais externo. De acordo com Albrecht *et al.* (2005) os genes *SERK1* e *SERK2* mostram um padrão de expressão complexa ao longo do desenvolvimento vegetal. Ambos são expressos no tapete da antera e são mediados por precursores. Mutantes *knockout* únicos de *SERK1* e *SERK2* não mostram fenótipos óbvios, porém mutantes duplos dão origem a machos estéreis devido a uma falha na especificação do tapete. A fertilidade pode ser restaurada por uma única cópia de qualquer um destes genes. As proteínas *SERK1* e *SERK2* podem formar homodímeros ou heterodímeros *in vivo*, sugerindo que eles são intercambiáveis no complexo de sinalização *SERK1/SERK2*. A proposta destes genes como marcadores estádio-específicos para embriogênese somática tem sido concebida para espécies agrônômicas como café (LACERDA *et al.*, 2008) e colza (AHMADI *et al.*, 2016). O gene *SERK3* aparece cinco vezes na análise filogenética em agrupamentos com o *SERK1* E *KINASE1*, isso pode ser explicado devido ao gene *SERK3* ter uma identidade genética parecida com o *BRI1-Associated Receptor Kinase1 (BAK1)* gene (ALBRECHT *et al.*, 2005).

Considerações finais

Algumas espécies agrônômicas já possuem sequências para *SERK* de forma bem descrita, porém trabalhos com espécies nativas ou frutíferas regionais brasileiras são ainda incipientes. Logo, estudos que envolvem marcadores estádio-específico otimizarão a propagação clonal e uniforme de plantas frutíferas do cerrado, embasando sua futura utilização para fins agrônômicos.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Genética da Conservação (LabGene) quanto ao apoio logístico na implementação e execução do projeto e a FAPEMIG pela concessão de bolsa de Iniciação Científica.

Referências bibliográficas

- ALBRECHT, C. *et al.* The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 control male sporogenesis. **Plant Cell**, v. 17, n. 12, p. 3337-3349. Dec., 2005
- AHMADI, B. *et al.* Molecular characterization and expression analysis of *SERK1* and *SERK2* in *Brassica napus* L.: implication for microspore embryogenesis and plant regeneration. **Plant Cell Rep.**, v. 35, n. 1, p.185-93, Jan., 2016.
- 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.
- 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.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 23 Ago. 2016.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, Oxford, v.4, p.406-425, 1987.
- SANTA-CATARINA, C. *et al.* *SERK* gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell Tissue Org. Cult.**, Netherlands, v. 79, p. 53-61, 2004.
- 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.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.
- 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.

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

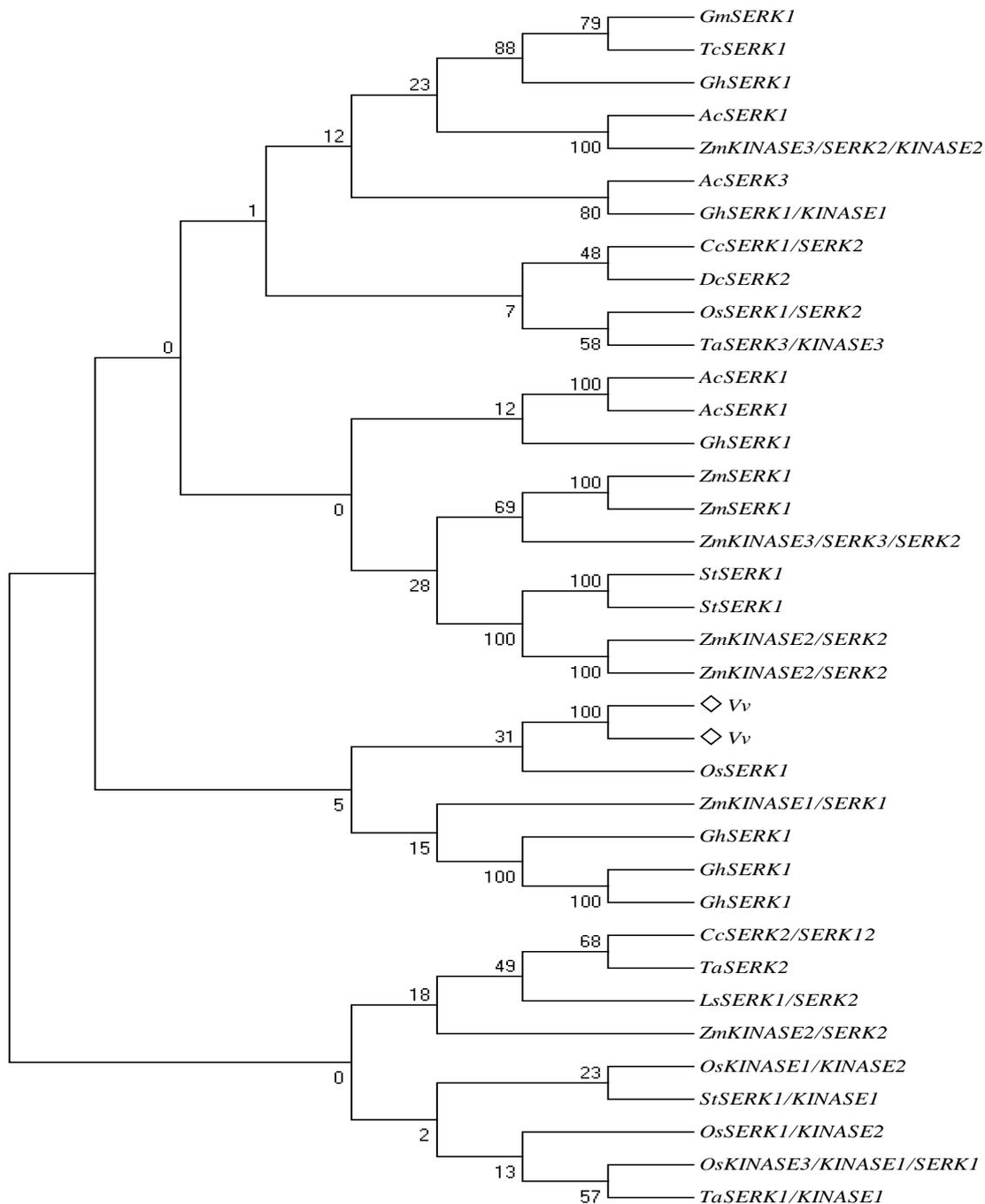


Figura 1. Árvore consenso gerada na análise *bootstrap*, método de Agrupamento de vizinhos (NJ) demonstrando relações filogenéticas para sequências SERK1, 2 e 3 entre as espécies agrônômicas: algodão (Gh - *Gossypium hirsutum*), videira (Vv - *Vitis vinifera*), abacaxi (Ac - *Ananas comosus*), arroz (Os - *Oryza sativa*), café (Cc - *Coffea canephora*), alface (Ls - *Lactuca sativa*), trigo (Ta - *Triticum aestivum*), milho (Zm - *Zea mays*), soja (Gm - *Glycine max*), cacau (Tc - *Theobroma cacao*), cenoura (Dc - *Daucus carota*) e batata-inglesa (St - *Solanum tuberosum*). A denominação KINASE refere-se a genes *LIKE*. \diamond = não foram encontradas informações sobre as sequências Vv.