

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio-Norte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Anais

II Jornada Científica

Embrapa Meio-Norte



Teresina, 14 e 15 de setembro de 2016

Embrapa Meio-Norte
Teresina, PI
2016

Embrapa Meio-Norte

Av. Duque de Caxias, 5.650, Bairro Buenos Aires
Caixa Postal 01
CEP 64006-220, Teresina, PI
Fone: (86) 3198-0500
Fax: (86) 3198-0530
www.embrapa.br/meio-norte
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Unidade responsável pelo conteúdo e edição

Embrapa Meio-Norte

Comitê de Publicações

Presidente: *Jefferson Francisco Alves Legat*

Secretário-administrativo: *Jeudys Araújo de Oliveira*

Membros: *Ligia Maria Rolim Bandeira, Flavio Favaro Blanco, Luciana Pereira dos Santos Fernandes, Orlane da Silva Maia, Humberto Umbelino de Sousa, Pedro Rodrigues de Araujo Neto, Carolina Rodrigues de Araujo, Danielle Maria Machado Ribeiro Azevedo, Karina Neob de Carvalho Castro, Francisco das Chagas Monteiro, Francisco de Brito Melo, Maria Teresa do Rêgo Lopes, José Almeida Pereira*

Normalização bibliográfica e editoração eletrônica: *Orlane da Silva Maia*

Capa: *Luciana Pereira dos Santos Fernandes*

1ª edição

Publicação digitalizada (2016)

Revisores Ad hoc (Embrapa Meio-Norte)

Aderson Soares de Andrade Junior, Adriana Mello de Araújo, Alitieni Moura Lemos Pereira, Ana Lúcia Horta Barreto, Angela Puchnick Legat, Braz Henrique Nunes Rodrigues, Bruno de Almeida Souza, Cândido Athayde Sobrinho, Edson Alves Bastos, Fabíola Helena dos Santos Fogaça, Francisco José de Seixas Santos, Geraldo Magela Côrtes Carvalho, João Avelar Magalhães, Jorge Minoru Hashimoto, José Ângelo Nogueira de Menezes Júnior, José Lopes Ribeiro, Lúcio Flavo Lopes Vasconcelos, Maria Clideana Cabral Maia, Maurisrael de Moura Rocha, Paulo Fernando de Melo Jorge Vieira, Paulo Henrique Soares da Silva, Raimundo Bezerra de Araújo Neto, Ricardo Montalvan Del Aguila, Rosa Maria Cardoso Mota de Alcântara, Tânia Maria Leal, Teresa Herr Viola, Valdenir Queiroz Ribeiro

Comissão organizadora

Coordenador: *Edvaldo Sagrilo*

Membros: *José Oscar Lustosa de Oliveira Júnior, Bruno de Almeida Souza, Flávio Favaro Blanco, Izabella Cabral Hassum, Jefferson Francisco Alves Legat, Paulo Sarmanho da Costa Lima, Danielle Maria Machado Ribeiro Azevedo, Juliana Priscila Sussai, Magda Cruciol, Orlane da Silva Maia, Francisco de Assis David da Silva*

A linguagem escrita, os conceitos e opiniões emitidos nos resumos constantes desta publicação, são de inteira responsabilidade dos respectivos autores. A Comissão Organizadora não assume responsabilidades pelos dados e conclusões apresentadas nos trabalhos publicados nos anais desta jornada.

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Meio-Norte

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Meio-Norte (2. : 2016 : Teresina, PI).

Anais da II Jornada Científica da Embrapa Meio-Norte / II Jornada Científica da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI, 13 a 14 de setembro de 2016. – Teresina : Embrapa Meio-Norte, 2016. 126 p.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <<http://www.cpamn.embrapa.br/jornada2016/downloads/EMBRAPAEBOOK.pdf>>.

1. Pesquisa científica. 2. Iniciação científica. 3. Agricultura. 4. Pecuária. 5. Tecnologia. I. Título. II. Embrapa Meio-Norte.

CDD 607

© Embrapa 2016

PRESENÇA DE ORTÓLOGOS DE GENES DE TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO NAS FORRAGEIRAS NATIVAS ANGICO DE BEZERRO E PAU-FERRO

Leonardo Furtado de Oliveira¹; Gizele de Andrade Luz²; Jéssica Barbara Vieira Viana³;
Raimundo Bezerra de Araújo Neto⁴; Paulo Sarmanho da Costa Lima⁵

¹Mestrando em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, leonardofurtado@hotmail.com

²Mestranda em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI

³Mestranda em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI

⁴Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI.

⁵Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI.

RESUMO

A utilização de genes ortólogos possibilita a prospecção e identificação de genes para espécies que não possuem sequências depositadas nos bancos de dados genômicos. A obtenção de genes relacionados à tolerância ao estresse hídrico em forrageiras nativas do Nordeste é importante no contexto de precipitações pluviais baixas e mal distribuídas na região. O objetivo deste trabalho foi verificar por meio de PCR a presença de ortólogos aos genes LEA, HSP70 e DREB envolvidos na resposta ao estresse hídrico em Alfafa (*Medicago truncatula*) nas forrageiras nativas Angico de Bezerra (*Pityrocarpa monoliformis*) e Pau-Ferro (*Caesalpinia férrea*). Através da reação da polimerase em cadeia (PCR) e eletroforese em gel de agarose, foi possível obter a confirmação que os genes HSP70, LEA e DREB estão presentes nas forrageiras consideradas, com boa eficiência de amplificação da PCR, possibilitando sua utilização em estudos de expressão gênica.

PALAVRAS-CHAVE: homólogos, sequências, prospecção

INTRODUÇÃO

O estresse hídrico é um dos principais fatores responsável por perdas consideráveis nas lavouras. Assim, a prospecção de genes associados às redes moleculares de respostas a esse fator adverso têm sido um desafio para a ciência, já que são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento visando à obtenção de plantas tolerantes. O enorme acúmulo de sequências de DNA e proteínas em bancos de dados públicos tem possibilitado a elucidação da função e expressão de novos genes (BINNECK, 2004), bem como o estudo de espécies, como as forrageiras nativas, que não foram sequenciadas, identificando genes de interesse por homologia com sequências encontradas para outras espécies nos bancos de dados genômicos (LINHART; SHAMIR, 2002).

Os genes originados de um mesmo gene ancestral são denominados de ortólogos. Devido à ancestralidade comum, esses genes expressam proteínas similares e desempenham funções análogas (MENEZES NETO, 2102). O uso de genes ortólogos pode ajudar a identificar e analisar a expressão de genes envolvidos na resistência ao déficit hídrico em forrageiras nativas do Semiárido nordestino. As sequências e funções de alguns desses genes se encontram nos bancos de dados públicos para outras espécies relacionadas evolutivamente com as forrageiras. Através de alinhamentos múltiplos dessas sequências, pode-se determinar sítios conservados para desenho de primers, possibilitando a amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) convencional ou estudos de expressão gênica através da PCR quantitativa em tempo real (MALONE et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi verificar por meio de PCR a presença de ortólogos aos genes LEA, HSP70 e DREB envolvidos na resposta ao estresse hídrico em Alfafa (*Medicago truncatula*) nas forrageiras nativas Angico de Bezerro (*Pityrocarpa monoliformis*) e Pau-Ferro (*Caesalpinia férrea*).

MATERIAL E MÉTODOS

A Tabela 1 mostra as sequências dos primers utilizados na amplificação dos genes (LEA, HSP70 e DREB). As sequências dos genes foram obtidas a partir de buscas no GenBank disponível no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), sendo posteriormente analisadas para obtenção de regiões conservadas para o desenho dos primers.

O par de primers de cada um dos genes foi testado em três acessos de forrageiras nativas da Embrapa Meio-Norte: dois de Angico de Bezerro (Ang.B1 e Ang.B2) e um de Pau-Ferro (PF3). As reações de PCR foram preparadas para 10µL/individuo, contendo concentrações de reagentes: 1x PCR buffer (Invitrogen); 2,5mM de MgCl₂ (Invitrogen); 0,5mM de dNTP's (Invitrogen); 0,25µM de cada primer; 1µL de DNA; 0,3 unidades de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e água ultrapura q.s.p 10 µL.

Tabela 1: Primers para os genes ortólogos envolvidos na resposta ao déficit hídrico.

GENE	ORIGEM	PRIMERS SENSO/ANTISENSE	TAM.	TM (°C)	%GC	T. AMPLICON
HSP	Alfafa	5' GTCGTCCTGTCCTGCTTACTT 3'	23 bp	58,5	52	168 bp
		5' CAACACGTTCTTCTACCAACT 3'	24 bp	59,2	46	
LEA	Alfafa	5' ATGACATTGGTGAGAAGATTGAGG 3'	24 pb	58,1	42	151 bp
		5' AAAGGAATTGGCACCGGATT 3'	20 bp	59,3	45	
DREB	Alfafa	5' GGAAATGGGTTGCTGAGATTAGG 3'	23 bp	59,8	48	123 bp
		5' AAGGACCATACATGGCTCTAGCAG 3'	24 bp	59,7	50	

As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems*) sob as seguintes condições: fase inicial de desnaturação de 1 minuto a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturação, 30 segundos para temperatura de anelamento, 30 segundos a 72°C para extensão e uma extensão final de 3 minutos a 72°C. As temperaturas de anelamento foram obtidas subtraindo 5°C da menor temperatura de melting do par de cada primer. Os produtos foram pré-corados com GelRed® 10.000X diluído (1:1000) aplicando 1µL em cada amostra e separados por eletroforese em gel de agarose (1,5%), conduzida a 60V por 2 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primers desenhados a partir de regiões conservadas de genes ortólogos de resistência ao déficit hídrico para Alfafa, (sem vírgula) encontraram sítio de anelamento nas amostras de DNA genômico de Angico de Bezerro e Pau-Ferro (Figura 1). Os genes LEA, HSP e DREB amplificaram o tamanho correspondente do amplicon da Tabela 1. Para os genes LEA e HSP não houve a ocorrência de amplificações inespecíficas. Para o gene DREB, ocorreram bandas inespecíficas para os acessos Ang.B1 e PF3. A imagem do gel da Figura 1 mostra que as reações de PCR aconteceram com ótima eficiência, amplificando bandas específicas intensas.

A obtenção de bandas bem definidas e intensas é de grande importância para estudos posteriores de expressão gênica envolvendo a técnica de PCR quantitativa em tempo real. O

sucesso dessa metodologia está intimamente ligado com a eficiência com que os primers se anelam, gerando os sinais de amplificação necessário para as análises (HEID et al., 1996).

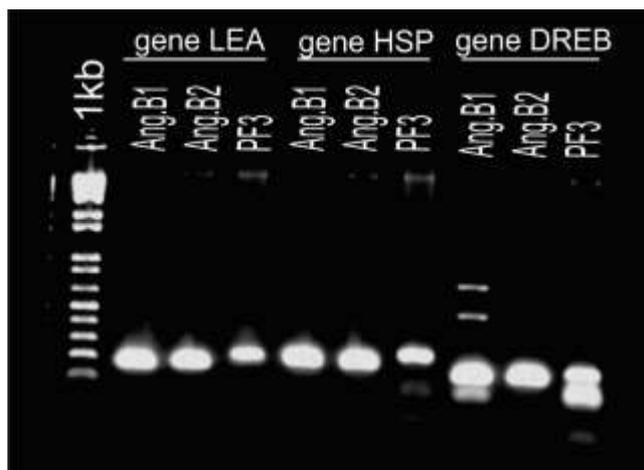


Figura 1: Gel de agarose para os genes LEA, HSP e DREB.

A ocorrência de bandas inespecíficas no gene DREB não chega a ser um problema, pois foi realizada apenas uma reação de PCR utilizando-se como temperatura de anelamento a menor temperatura de melting do par de cada primer menos 5°C, ou seja, há espaço para otimizar a reação pelo aumento da temperatura e também ajustando-se a concentração de MgCl₂.

CONCLUSÕES

As reações de PCR confirmaram a presença dos genes ortólogos envolvidos na resposta ao déficit hídrico nas amostras de forrageiras nativas Angico de Bezerra e Pau-Ferro, possibilitando incluir esses genes em estudos de expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.

Agradecimentos: Embrapa Meio-Norte.

REFERÊNCIAS

- BINNECK, E. As Ômicas: integrando a bioinformação. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 32, p. 28-37, jan./jun. 2004.
- HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.
- LINHART, C.; SHAMIR, R. The degenerate primer design problem. **Bioinformatics**, Oxford, v. 18, p. S172-S180, 2002. Suppl. 1.
- MALONE, G. et al. Prospecção de genes em bibliotecas de cDNA. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 1, p. 7-13, jan./mar. 2006.
- MENEZES NETO, A. **Aprimoramento da anotação N-terminal de proteínas através da predição de peptídeo sinal em proteínas ortólogas e desenvolvimento de uma ferramenta automática para a identificação de grupos ortólogos contendo erros de anotação**. 2012. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte.