



CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA SUBTRATIVA DE CDNA DE BOTÃO FLORAL DE ALGODOEIRO¹

Morganna Pollyne Nóbrega Pinheiro¹; Vandré Guevara Lyra Batista⁴; Natália Florencio Martins⁵;
Péricles de Albuquerque Melo Filho³; Roseane Cavalcanti dos Santos²; Liziane Maria de Lima²

¹Estudante de Pós-Graduação da UFRPE (morgannapollynne@yahoo.com); ²Pesquisadora da Embrapa Algodão;
³Pesquisador da UFRPE; ⁴Bolsista CNPq; ⁵Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

RESUMO – Com o advento da biotecnologia e a manipulação genética do algodoeiro por transgênese, um novo arsenal de estratégias de proteção contra pragas foi disponibilizado. Uma ferramenta importante para esta estratégia é a prospecção de genes. Neste trabalho construiu-se uma biblioteca subtrativa de cDNA de botão floral de algodoeiro da variedade BRS 8H. Os clones foram sequenciados e montados, o que resultou em 168 unigenes, sendo 38 contigs e 130 singlets. Para as análises *in silico* foram utilizados o banco de dados do algodão (BLASTn), como também o de *A. thaliana* (WU-BLAST2), visto que muitos genes identificados em algodão não estão estudados funcionalmente, mas apresentam homologia com genes de outras espécies. O transcriptoma revelou um grande número de transcritos com função desconhecida, além de várias sequências relacionadas a fibras e óvulos em diferentes estágios, dentre estas, o contig mais populado, foi identificado como Fibra de 0-10 dias pós antese, com 12 reads. O índice de Sucesso e de Novidade da biblioteca gerada foi de 67 e 51%, respectivamente. As informações obtidas proporcionam um quadro para a investigação futura da genômica funcional de algodão.

Palavras-chave – *Gossypium hirsutum* L., prospecção de genes, transcriptoma

INTRODUÇÃO

A cultura do algodão é de grande expressão socioeconômica para os setores primário e secundário do Brasil, com uma área de 852,6 mil hectares, sendo classificada entre as dez principais culturas agrícolas. Porém, um dos fatores que limita a produção desta cultura é o ataque de insetos-pragas. A planta de algodão é susceptível ao ataque de diversas pragas que podem causar danos a diferentes partes da planta, como: raízes, caule, folhas, botões florais, flores, maçãs e capulhos. As principais pragas que atacam a cultura do algodão é o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) e a lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*) que atacam os botões florais, flores e maçãs jovens; além da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) que ataca os tecidos foliares (SANTOS, 2007). Para

¹ Instituições financiadoras: Embrapa Algodão / MONSANTO / CAPES





controlar essas pragas, pesquisadores vêm buscando alternativas de controle por meio da modificação genética, para que a planta GM libere proteínas com atividade inseticida apenas para o inseto alvo.

O botão floral do algodoeiro possui vários genes promissores que podem ser utilizados para a busca de promotores tecido específico. As plantas expressando uma proteína inseticida, na qual a expressão é dirigida por um promotor específico, diminui ou mesmo anula a ocorrência de atingir insetos não alvos, pelo fato da expressão ser direcionada para o tecido específico. O algodoeiro é uma das espécies vegetais, juntamente com *Arabidopsis thaliana*, para a qual existe bancos de dados de ESTs oriundos do sequenciamento em larga escala de diversas bibliotecas de cDNA, sintetizadas a partir de diferentes tecidos e estágios fisiológicos da planta.

A utilização das informações dos bancos de DNA e proteínas é de grande utilidade para a elucidação da função e expressão de novos genes. A estratégia de prospecção de genes de interesse em genótipos não sequenciados, através da utilização de informações geradas em projetos genoma ou proteoma, envolve etapas importantes como construção de bibliotecas de cDNA, triagem dessas bibliotecas, análise comparativa das sequências com os bancos de dados, identificação dos domínios conservados e desenho de *primers* (BINNECK, 2004).

Este trabalho teve como objetivo construir uma biblioteca subtrativa de cDNA a fim de prospectar genes de botões florais do algodoeiro. Para no futuro, estes genes serem utilizados na busca de promotores tecido específico e assim atender a demanda dos programas de melhoramento do algodoeiro via transgenia existentes na Embrapa.

METODOLOGIA

Material Vegetal

Para a confecção das bibliotecas foram utilizadas plantas de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) da variedade BRS 8H, semeadas em vasos e mantidas em telado de vegetação. Botões florais, raízes, caule e folhas foram coletados em diferentes fases de desenvolvimento, imediatamente congelados em N₂ líquido e mantidos a -80°C.

Extração do RNA total

Para a extração de RNA total da raiz, caule e folha foi utilizado o reagente *Concert RNA extraction kit* (Invitrogen) e para a extração de RNA total dos botões florais foi utilizado o *Invisorb Spin*





Plant RNA Mini kit (Invitac), seguindo as recomendações dos fabricantes. Os RNAs totais foram corados com SYBR green, analisados em gel de agarose 0.8% e fotodocumentados.

Construção da biblioteca subtrativa de cDNA

A síntese dos cDNAs foi realizada a partir do RNA de botão floral e da mistura de RNA de folha, caule e raiz utilizando o *Super SMART PCR cDNA Synthesis Kit* (Clontech) de acordo com as recomendações do fabricante. A reação foi incubada em um termociclador nas seguintes condições: 65°C durante 2 minutos, com uma pausa para a adição da enzima e 42°C durante 90 minutos. Em seguida, os cDNAs foram submetidos a hibridização subtrativa para seleção dos transcritos diferenciais de acordo com o protocolo descrito no kit *PCR Select cDNA Subtraction* (Clontech).

Clonagem das ESTs em vetor de transformação de bactérias

As ESTs geradas a partir da biblioteca subtrativa foram ligadas ao Vetor pGEM-T Easy (Promega) e utilizadas para transformar células de *E. coli* linhagem XL1-blue, por eletroporação (LIMA, 2005).

Clusterização e análise de sequências

Os clones gerados foram sequenciados na Plataforma de Sequenciamento da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A análise da qualidade das sequências foi feita com o programa PHRED e a clusterização foi realizada por meio do programa TGICL. O gerenciamento das sequências foi realizado pelo SISGEN (PAPPAS et al., 2008), seguida da anotação automática com o programa BLASTX 2.2.3 contra os bancos de dados do GenBank, MIPS, KOG.v.1.0, Pfam e Swissprot (FINN et al., 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pool de cDNA isolado gerou uma biblioteca com 2×10^3 ufc/mL. O sequenciamento resultou em um total de 711 sequências. Foram consideradas válidas e utilizadas para as análises posteriores 480 sequências. Ao final da clusterização foram formados 168 unigenes, sendo 38 contigs e 130 singlets (Figura 1). Esta análise revelou o contig mais populado, identificado como Fibra de 0-10 dias pós antese, com 12 reads.

A partir desses dados foi possível determinar o índice de Sucesso da biblioteca, em torno de 67%, bem como o índice de Novidade, com 51%. Resultados similares foram descritos por Takahashi





(2005), com uma biblioteca subtrativa de cDNA de raízes de cana-de-açúcar, onde obteve um índice de Sucesso em torno de 63% e o índice de Novidade de 87%.

Adicionalmente, foi realizada análise para cada contig no BLASTn do Cotton Genome Database (<http://cottondb.org/blast/blast.html>) e no WU-BLAST2 de *Arabidopsis thaliana* (<http://www.arabidopsis.org/>), com o objetivo de comparar a função dos genes nesses dois bancos, visto que muitos genes identificados em algodão não estão estudados funcionalmente, mas apresentam homologia com genes de outras espécies que já tem suas funções descritas (Tabela 1).

As análises *in silico* nos bancos de dados do algodão e de *A. thaliana*, mostraram homologia entre alguns contigs. O CL2Contig2 e CL28Contig1, para *G. hirsutum*, refere-se a fibra de 0-10 e de 1-3 dias pós a antese, respectivamente, no entanto, em *A. thaliana*, as funções destes genes já se encontram definidos, estando relacionados com a maturação do pólen (TRIONNAIRE, 2009).

O contig CL13Contig1, foi identificado para *G. hirsutum*, como sendo um gene relacionado a óvulos e fibras. Em *A. thaliana*, este gene participa do processo metabólico da beta galactosidade, enzima relacionada ao metabolismo de carboidratos da parede celular vegetal (OLIVEIRA JÚNIOR, 2004).

Os contigs CL1Contig2, CL1Contig1, CL1Contig5, CL1Contig3 estão relacionados a fibras no banco de dados do *G. Hirsutum*, porém no banco de *A. thaliana* estes genes já foram descritos e estão envolvidos no processo catabólico metilglioxal de D-lactato (MAKAROFF, 1997).

Embora muitos genes tenham sido estudados quanto a sua funcionalidade, existem outros cuja função não foi ainda definida, como por exemplo os contigs: CL19Contig1 relacionado a óvulos imaturos de -3 a 3 dias pós antese, com ou sem fibra; CL7Contig1 relacionado a fibra; CL3Contig1 e CL3Contig2 relacionado a fibra e óvulo (Tabela 1).

CONCLUSÃO

A biblioteca subtrativa mostrou-se eficiente para o isolamento de genes diferencialmente expressos no botão floral do algodoeiro.

A biblioteca apresentou um índice de sucesso de 67% e um índice de Novidade de 51%.

Os resultados obtidos até o momento auxiliarão na seleção de genes promissores para serem utilizados na busca de promotores tecido específicos.





REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BINNECK, E. As ômicas: integrando a bioinformação. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Brasília, n. 32, p. 28-37, 2004.

FINN, R.; MISTRY, J.; SCHUSTER-BOCKLER, B.; GRIFFITHS-JONES, S.; HOLLICH, V.; LASSMANN, T.; MOXON, S.; MARSHALL, M.; KHANNA, A.; DURBIN, R.; EDDY, S.; SONNHAMMER, E.; BATEMAN, A. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Research*, v. 34, p. D247–D251, 2006.

LIMA, L.M. Caracterização molecular e imunológica de anticorpos desenvolvidos contra proteínas de nematóides de galhas de raiz. Tese (Doutorado), Universidade de Brasília, Brasília, 2005.

MAKAROFF, C.A; MAITI, M.K.; KRISHNASAMY, S.; OWEN, H.A. Molecular characterization of glyoxalase II from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, v. 35, n. 4, p. 471 – 481, 1997.

OLIVEIRA JÚNIOR, F.C. Carboidratos de parede celular e efeitos de oligossacarídeos de xiloglucano sobre o crescimento celular de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. cultivada em suspensão. Tese (Doutorado), **Universidade de São Paulo (USP). Instituto de Biociências, São Paulo, 2004.**

PAPPAS, G.J.JR.; MIRANDA, R.P.; MARTINS N.F.; TOGAWA R.C.; COSTA, M.M.C. SisGen: A CORBA Based Data Management Program for DNA Sequencing Projects **Lecture Notes in Computer Science**, v. 5109, p. 116-123, 2008.

SANTOS, W. J. Manejo das pragas do algodão com destaque ao cerrado brasileiro. In: FREIRE, E. C. (Ed.). *Algodão no Cerrado do Brasil*. Brasília, DF: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2007. p. 403-406.

TAKAHASHI, D. Análise se sequências expressas em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Gomus clarum*. Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.

TRIONNAIRE, G. L.; DOWNTON, R. G.; HAFIDH, S.; SCHMID, R.; DICKINSON, H.; TWELL, D. MicroRNA profiling of *Arabidopsis thaliana* mature pollen. *Plant Molecular*, v.1, p. 1-13, 2009.



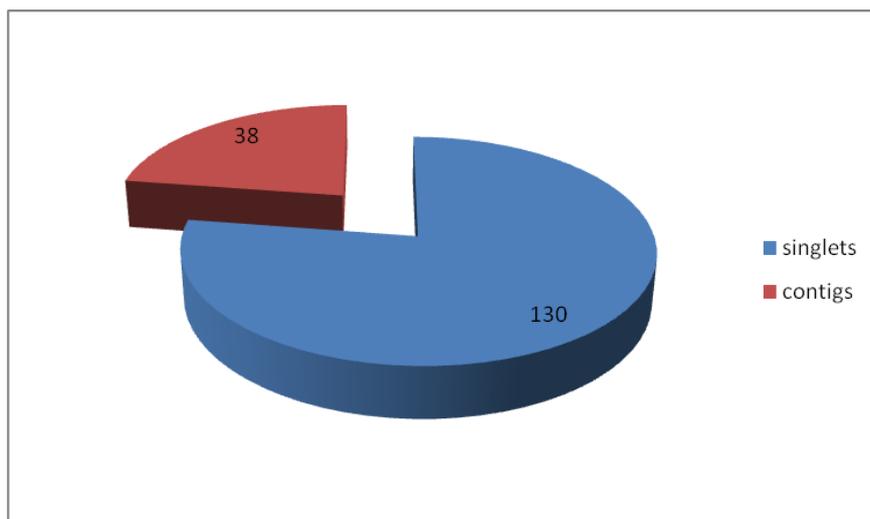


Fig. 1

Tabela 1 - CL19Contig1 relacionado a óvulos imaturos de -3 a 3 dias pós antese, com ou sem fibra; CL7Contig1 relacionado a fibra; CL3Contig1 e CL3Contig2 relacionado a fibra e óvulo

| Contig | Nº de Reads | Anotação | Organismo Homólogo | E-value |
|-------------|-------------|--|--|-----------------|
| CL2Contig2 | 12 | Fibra de 0-10 dpa Maturação do pólen | <i>G. hirsutum</i> <i>A. thaliana</i> | 0.0 8e-15 |
| CL1Contig2 | 8 | Fibra de 7-10 dpa Processo catabólico metilgloxal de D-lactato | <i>G. hirsutum</i> <i>A. thaliana</i> | e-148 4e-13 |
| CL7Contig1 | 4 | Biblioteca de fibra Função desconhecida | <i>G. hirsutum</i> <i>A. thaliana</i> | 5e-34 e-47 |
| CL1Contig1 | 4 | Fibra Processo catabólico metilgloxal de D-lactato | <i>G. hirsutum</i> <i>A. thaliana</i> | e-150 1e-13 |
| CL13Contig1 | 3 | Óvulo e fibra Processo metabólico carboidrato (beta-galactosidase) | <i>G. hirsutum</i> <i>A. thaliana</i> | 0.0 4e-07 |
| CL1Contig5 | 3 | Fibra de 5 dpa Processo catabólico metilgloxal de D-lactato | <i>G. hirsutum</i> <i>A. thaliana</i> | e-134 5e-12 |
| CL19Contig1 | 2 | Óvulos imaturos de -3 a 3 dpa, com ou sem fibra Função desconhecida | <i>G. hirsutum</i> <i>A. thaliana</i> | 0.0 8e-13 |
| CL3Contig1 | 2 | Fibra e óvulo Proteína desconhecida | <i>G. hirsutum</i> <i>A. thaliana</i> | 4e-156 6e-9 |
| CL3Contig2 | 2 | Fibra e óvulo Proteína desconhecida | <i>G. hirsutum</i> <i>A. thaliana</i> | e-158 6e-9 |
| CL28Contig1 | 2 | Fibra 1-3 dpa Maturação do pólen | <i>G. hirsutum</i> <i>A. thaliana</i> | 6e-99 e-68 |
| CL1Contig3 | 2 | Biblioteca de fibra Processo catabólico metilgloxal de D-lactato | <i>G. hirsutum</i> <i>A. thaliana</i> | 4e-134 1e-12 |