

SELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA PARA ANÁLISE DE METILAÇÃO EM VARIANTES FENOTÍPICOS DE CACTOS DO GÊNERO *CEREUS* (CACTACEAE)

Everaldo dos Santos, Sanny Damazio Domingues (PIBIC/AF/IS-CNPq-UEM), Maria de Fatima Pires da Silva Machado (Orientador), e-mail: mfpsmachado@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular / Centro de Ciências Biológicas/Maringá, PR.

Área: 20200005 - Genética. Subárea: 20203004 - Genética Vegetal

Palavras-chave: epigenética, expressão gênica, proteínas

Resumo

Entre as plantas do gênero *Cereus*, existem duas variedades descritas para a espécie *Cereus peruvianus*, que são plantas ornamentais, amplamente cultivadas em jardins residenciais e parques públicos de áreas urbanas: as variedades *tortuosus* e *monstruosus*. Como não há resultados conclusivos sobre a heterogeneidade fenotípica do gênero com a utilização de marcadores moleculares, o objetivo do presente estudo foi estabelecer uma técnica adequada para investigar se os variantes fenotípicos de cactos do gênero *Cereus* são resultantes de variações epigenéticas, decorrentes de alterações no padrão de metilação do DNA. Para isto, foram aplicados testes de padronização para o sequenciamento de genes relacionados com a morfologia vegetal (genes para as proteínas actina, formina, extensina, expansina e celulose-sintase).

Introdução

O gênero *Cereus* consiste em um táxon pertencente à Família Cactaceae. As plantas deste gênero, conhecidas popularmente como mandacaru, são encontradas principalmente em viveiros, jardins residenciais e parques públicos de áreas urbanas. A espécie *C. peruvianus* Mill. tem descritas as variedades morfológicas *tortuosus*, que apresentam caules com costelas em espiral, e a variedade *monstruosus* que possui o caule com costelas formando sulcos irregulares (HUNT, 2006).

Como a heterogeneidade fenotípica entre variedades *tortuosus* e *monstruosus* utilizando marcadores moleculares não foram conclusivas (FERNANDES et al., 2016), a hipótese no presente estudo é que a ocorrência de variações epigenéticas podem ser os fatores determinantes da diversidade fenotípica entre as referidas variedades. O termo epigenética, segundo Tang e Ho (2007), é definido como mudanças na expressão do gene sem alterações na sequência do DNA, mas que são herdáveis ao longo das gerações.

Uma vez que as variedades *tortuosus* e *monstruosus* podem ter se originado como resultado de modificações epigenéticas, o objetivo do presente estudo foi estabelecer uma técnica adequada para investigar a ocorrência de variações

epigenéticas decorrentes de alterações no padrão de metilação do DNA em plantas das variedades *tortuosus* e *monstruosus* do gênero *Cereus*.

Materiais e métodos (Arial 12, Negrito, alinhado à esquerda)

1. *Extração de DNA Genômico*: O DNA foi extraído de caules frescos (40-80 mg) de plantas de *Cereus* (três plantas de cada morfologia: caules ereto, *tortuosus* e *monstruosus*), que estão sendo cultivadas no banco de germoplasma do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (DBC/UEM) (Figura 1). As amostras foram preparadas individualmente de acordo com o protocolo descrito por Aljanabi et al. (1999).
2. *Quantificação do DNA*: A quantificação do DNA extraído foi realizada por espectrofotometria no NanoDrop™ Thermo Scientific™ Lite Spectrophotometer.
3. *Síntese dos primers*: Foram selecionadas cinco proteínas relacionadas à morfologia dos cactos (actina, celulose-sintase, expansina, extensina e formina), e foram desenhados *primers* no software BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para as sequências de DNA de tais proteínas. Como a sequência dos *primers* para espécies do gênero *Cereus* não está disponível no banco de dados (*GenBank*), as sequências de *primers* foram retiradas do mRNA, de diferentes espécies (Tabela 1).
4. *Amplificação do DNA com os primers*: Em princípio foram seguidas as condições de PCR baseadas em Domingues et al. (2017). Posteriormente, foram realizados testes com diferentes temperaturas de anelamento e concentrações de MgCl₂. As temperaturas testadas foram de 40°C a 68°C, e as concentrações de MgCl₂ de 2,0 mM, 2,5mM, 3,0mM, 4,0mM, e 4,5mM. O produto de cada amplificação foi submetido à eletroforese feita em gel de agarose 1,7%, com 60 V durante 4 horas. Para estimar o tamanho das sequências amplificadas foi utilizado o marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Invitrogen). A coloração do gel foi feita usando uma solução de brometo de etídio 0,5 mg/mL, e a imagem foi capturada em um transiluminador L-PIX HE, Loccus Biotecnologia.
5. *Análise dos dados*: As sequências dos *primers* disponíveis no programa BLAST foram usadas para estimar por comparação o tamanho dos fragmentos amplificados, observado nos caules das plantas de *Cereus* (Tabela 1). As sequências de DNA amplificadas foram enviadas para sequenciamento na empresa de Biotecnologia BPI BIOTECNOLOGIA E INOVAÇÃO, do Município de Botucatu (SP).

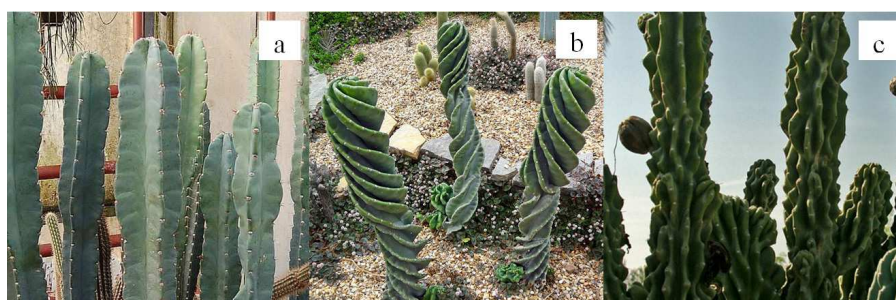


Figura 1 – Diferentes morfologias dos caules de *Cereus peruvianus*: ereto (a), *tortuosus* (b), *monstruosus* (c).

Tabela 1 – Sequências dos *primers* sintetizados no BLAST.

Proteína	Sequência Forward	Sequência Reverse	Espécie
Actina	TCTCCAAGAGAGGTCGTTGC	GTTGCGCTACCAGAGTCGTA	<i>Hylocereus polyrhizus</i>
Celulose-Sintase	TGGAAGCGGTAGAACCGAAA	GATTGGGGCTAAGTTCGGGG	<i>Chenopodium quinoa</i>
Expansina	GGCTGTTTTGGGCTTCTGT	ACACCCAGTGGCAGTAGAGT	<i>Rumex palustris</i>
Extensina	AGGTTTTCTTAGCCTTGCCCA	GTTGTAAGGTGCAGCAGGA	<i>Beta vulgaris</i>
Formina	GTTCTTTGGAGGTGGGAACA	GTCCAGTGAACCAAGTCA	<i>Chenopodium quinoa</i>
Actina	CTGGGTTTGCTGGGGATGAT	ACGGCCTGAATGGCAACATA	<i>Hylocereus polyrhizus</i>
Formina	TCGGATCGAGCTACCGTGT	TTCAGCAACCTCATCCCGAG	<i>Chenopodium quinoa</i>

Resultados e Discussão

A metodologia utilizada para a extração do DNA foi considerada como eficiente, porque foi possível obter uma solução de DNA livre de polissacarídeos. As concentrações das amostras de DNA variaram de 15 a 150 ng/μL. As temperaturas de anelamento e as concentrações de MgCl₂ mais adequadas, bem como os tamanhos dos fragmentos esperados e o tamanho aproximado dos fragmentos observados em pb (pares de bases) estão listados na Tabela 2 e demonstrados na Figura 2. A diferença entre os tamanhos dos fragmentos esperados e observados pode ser devido ao fato de que os *primers* foram desenhados a partir de sequências de outras espécies que não de *Cereus*.

Tabela 2 – Temperaturas de anelamento e concentrações de MgCl₂ mais adequadas para amplificação dos genes e tamanhos dos fragmentos esperados e observados em pb.

Proteína	Temperatura	Concentração de MgCl ₂	Tamanho do fragmento esperado	Tamanho do fragmento observado
Actina	40°C	4,0 mM (3,2 μL)	726 pb	650 pb
Formina	57°C	4,0 mM (3,2 μL)	603 pb	1000 pb
Extensina	49°C	4,0 mM (3,2 μL)	685 pb	900 pb
Expansina	51°C	3,0 mM (2,4 μL)	785 pb	700 pb
Celulose Sintase	49°C	3,0 mM (2,4 μL)	680 pb	550 pb

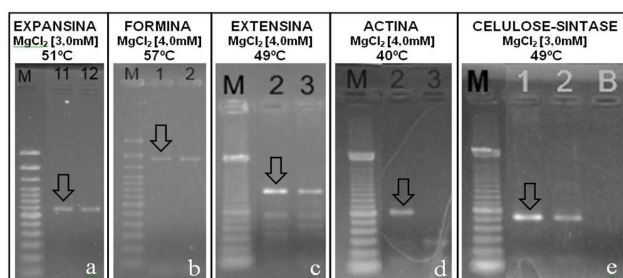


Figura 2 – Géis correspondentes aos genes amplificados das proteínas expansina (a), formina (b), extensina (c), actina (d) e celulose sintase (e) apontados pela seta. DNAs utilizados: em “a” caules ereto (11) e *tortuosus* (12); em “b” caules ereto (1) e *tortuosus* (2); em “c” caules *monstruosus* (2) e *tortuosus* (3); em “d” caules *monstruosus* (2) e *tortuosus* (3); em “e” caules *monstruosus* (1), *tortuosus* (2) e branco (B).

Na Figura 2, é possível observar a amplificação dos genes da expansina, formina, actina e celulose-sintase que apresentaram apenas um fragmento (banda),

enquanto a amplificação do gene para extensina apresentou bandas inespecíficas (mesmo após diversos testes de temperatura e de $MgCl_2$) sugestivo de amplificações adicionais de sequências do DNA inespecíficas.

Após o sequenciamento das amostras de DNA dos genes para as proteínas expansina, formina, extensina, actina e celulose sintase, estas foram usadas para conferir se havia homologia dos genes das referidas proteínas para o gênero *Cereus* com os genes disponíveis no programa BLAST. Entretanto, os resultados dos sequenciamentos mostraram que não houve homologia dos genes das proteínas disponíveis no programa BLAST com as sequências de DNA amplificadas do gênero *Cereus*. É possível que esta falta de homologia seja decorrente de anelamentos não exatos dos *primers* que foram desenhados a partir de outras espécies.

Conclusões

Embora a metodologia aplicada no presente estudo não tenha sido adequada para a amplificação específica dos genes de actina, formina, extensina, expansina e celulose-sintase no DNA das plantas do gênero *Cereus*, as informações obtidas são cientificamente relevantes por se tratar de um estudo pioneiro na área. A perspectiva é desenhar e testar *primers* para os genes das referidas proteínas de outras espécies de plantas para amplificar o DNA das plantas de *Cereus*.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná - Fundação Araucária (Processo 5560/ 2017) pelo suporte financeiro para a realização deste estudo.

Referências

ALJANABI, S. M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide- and polyphenol-free sugarcane DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 1-8, 1999.

FERNANDES, V. N. A. et al. Genetic structure and molecular divergence among samples of mandacaru (*Cereus* spp.; Cactaceae) as revealed by microsatellite markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 64, p. 38-45, 2016.

DOMINGUES, S. D. et al. Seleção de *primers* para análise de *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) em *Cereus* sp. (Cactaceae). **Revista Biotecnologia & Ciência**, v. 6, n. 2, p. 46-54, 2017.

HUNT, D.; TAYLOR, N.P.E.; CHARLES, G. **The New Cactus Lexicon**. UK: DH books, 2006.

TANG, W.; HO, S. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 8, n. 2, p. 173-82, 2007.