



ANÁLISE *IN SILICO* DA HOMOLOGIA ENTRE GENES DE ARROZ ENVOLVIDOS NA HOMEOSTASIA DA ÁGUA E BANCOS ESTs DE AVEIA

SILVEIRA, Carla Ferreira^{1,2}; MAIA, Luciano Carlos da¹; CHAVES, Ana Lúcia Soares^{1,3}; COSTA de OLIVEIRA, Antonio^{1,2}.

¹Centro de Genômica e Fitomelhoramento – FAEM/UFPEL Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. carlafesil@hotmail.com. ²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - UFPEL. ³Departamento de Bioquímica – IQG/UFPEL.

1. INTRODUÇÃO

As plantas absorvem e perdem água continuamente. Além disso, a água é o solvente que permite que gases, minerais e outras substâncias possam penetrar nas células e fluir entre as mesmas e entre os vários órgãos do vegetal. De todos os recursos de que a planta necessita para se desenvolver, a água é o mais abundante e o mais limitante para a produtividade agrícola, tornando, assim, a compreensão a respeito de absorção e perda de água pelas plantas muito importante. Recentemente, com a descoberta da existência das aquaporinas, explicaram-se as taxas de movimento de água observadas através das membranas, uma vez que a água circula mais rapidamente através desses canais do que pela dupla camada lipídica (Maurel, 1997; Agre & Kozono, 2003).

Considerando que as espécies pertencentes à família *Poaceae* tenham divergido de um ancestral comum há cerca de 60 milhões de anos (Wilson *et al.*, 1999), é provável que as gramíneas de interesse agrônomo tenham sofrido as mesmas modificações também nos genes envolvidos com o transporte de água. Estudos de genômica comparativa têm reforçado esta hipótese, demonstrando que a colinearidade dos genes geralmente é bem conservada entre os genomas das gramíneas (Bennetzen & Freeling, 1997).

O conhecimento do genoma completo do arroz e a sintonia com genomas de outras gramíneas como trigo, milho, aveia, cevada e sorgo (Devos & Gale, 2000) propiciou que genes homólogos (sequências com similaridade atribuída devido à descendência de um ancestral comum) sejam obtidos mais facilmente também em aveia, possibilitando a transferência de informações genéticas de espécies modelos para aquelas espécies com poucos investimentos em pesquisa genômica ou para espécies com importância regional (Bennetzen & Freeling, 1997; Varshney *et al.*, 2005).

A análise das sequências dos genes e o estudo das relações filogenéticas contribuem significativamente na escolha de estratégias de transferibilidade entre a espécie modelo (como arroz) e espécie órfã (como aveia), direcionando a busca de genes candidatos para posteriores estudos. Baseando-se nesta estratégia, o

objetivo deste trabalho foi buscar sequências homólogas a genes de arroz relacionados com a homeostasia da água na aveia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Centro de Genômica e Fitomelhoramento – FAEM/UFPel, em maio de 2009. O banco de dados de sequências ESTs (*expressed sequence tags*) de *Avena sativa* (10.383 sequências), assim como os 33 genes expressos em *Oryza sativa* relacionados com a homeostasia da água (Sakurai *et al.*, 2005), foram obtidos no GenBank® (NCBI). A redundância do banco de dados de sequências ESTs de *Avena sativa* foi eliminada através do programa CAP3 (Huang & Madan, 1999).

Os genes foram alinhados contra o banco de dados de sequências ESTs utilizando-se o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990), considerando-se como sequências homólogas aquelas com mais de 100bp (pares de bases) e com *E-value* menor que e^{-10} . Posteriormente foi realizado um alinhamento global entre as sequências para a seleção das regiões mais conservadas. As sequências selecionadas foram submetidas a alinhamento múltiplo no programa Clustal-W e ao programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007), utilizando o método de agrupamento *Neighbor Joining* (Saitou & Nei, 1987) com *Bootstrap* de 1000 repetições para a construção dos cladogramas (Felsenstein, 1985).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

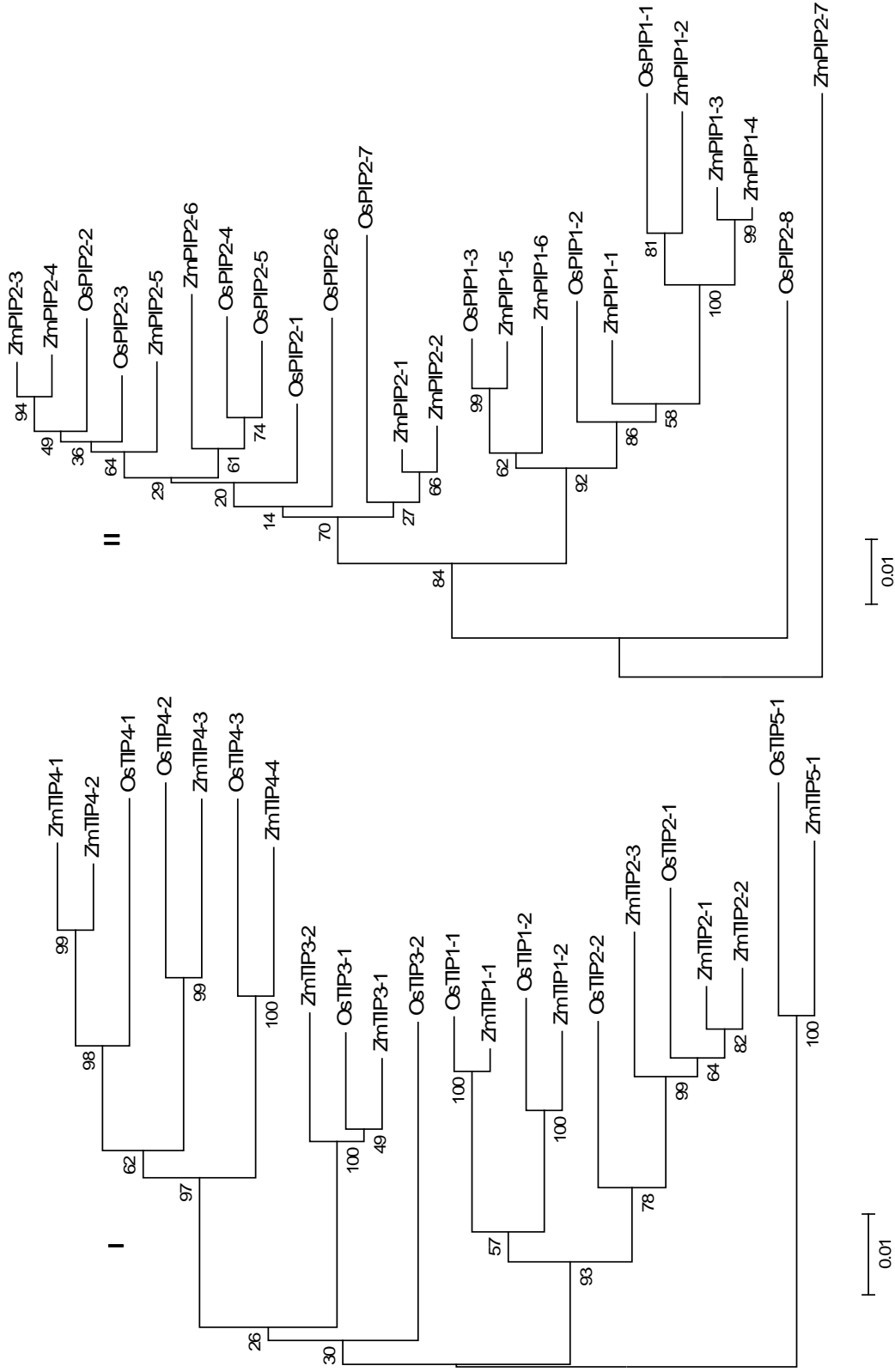
Dos 33 genes de aquaporinas de arroz alinhados contra o banco de ESTs de aveia, somente 13 sequências homólogas foram encontradas no banco. Para os genes OsPIP1-1 e OsPIP1-3 foram encontradas seis sequências homólogas, enquanto que para OsPIP2-7, OsPIP2-8, OsTIP1-1 e OsTIP1-2 foi encontrada apenas uma sequência.

O número de sequências de ESTs homólogas a genes de arroz relacionados com a homeostasia da água estão listados na Tabela 1. Todas as sequências encontradas apresentam valores de *E-value* significativos ($<e^{-10}$), mostrando que os alinhamentos não foram ao acaso.

Os cladogramas apresentados (Figura 1) são dos genes de aquaporinas de arroz da subfamília TIP (*tonoplast intrinsic proteins*) e PIP (*plasma membrane intrinsic proteins*), juntamente com seus correspondentes da espécie *Zea mays* (Chaumont *et al.*, 2001), também pertencente à família *Poaceae*.

Tabela 1. Genes de arroz relacionados com homeostasia de água e número de homólogos.

| Genes | Nº de sequências homólogas em aveia | Melhor e-value | Identidade (%) |
|----------|-------------------------------------|----------------|----------------|
| OsPIP1-1 | 6 | $7e^{-36}$ | 87 |
| OsPIP1-3 | 6 | $5e^{-46}$ | 85 |
| OsPIP2-1 | 3 | e^{-166} | 89 |
| OsPIP2-2 | 4 | 0 | 87 |
| OsPIP2-3 | 4 | 0 | 87 |
| OsPIP2-4 | 3 | 0 | 86 |
| OsPIP2-5 | 3 | e^{-150} | 89 |
| OsPIP2-6 | 3 | e^{-58} | 84 |
| OsPIP2-7 | 1 | e^{-31} | 83 |
| OsPIP2-8 | 1 | e^{-18} | 82 |



| | | | |
|----------|---|------------|----|
| OsTIP1-1 | 1 | e^{-40} | 87 |
| OsTIP1-2 | 1 | $4e^{-43}$ | 89 |
| OsTIP2-2 | 2 | $2e^{-14}$ | 89 |

Figura 1. Cladograma das subfamílias gênicas de aquaporinas de *Oryza sativa* (Os) e *Zea mays* (Zm).
 I. Subfamília TIP. II. Subfamília PIP.

4. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram a existência de 13 sequências homólogas preservadas entre as espécies escolhidas para este estudo. Contudo, é preciso considerar que o número de sequências provavelmente está subestimado, pois o banco de dados da aveia é pequeno quando comparado com as informações disponíveis sobre o genoma de outras gramíneas como o arroz e o milho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRE, P.; KOZONO, D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. **FEBS Letters**, 2003, v.555, p. 72-78.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.

BENNETZEN, L. J.; FREELING, M. The Unified Grass Genome: Synergy in Synteny. **Genome Research**, 1997, v.7, p.301-306.

CHAUMONT, F.; BARRIEU, F.; WOJCIK, E.; CHRISPEELS, M. J.; JUNG, R. Aquaporins Constitute a Large and Highly Divergent Protein Family in Maize. **Plant Physiology**, 2001, v. 125, p. 1206–1215.

DEVOS, K. M.; GALE, M. D. Genome Relationships: The Grass Model in Current Research. **Plant Cell**, 2000, v.12, p. 637-646.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, 1985, v. 39, p. 783-791.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, 1999, v.9, p. 868-877.

MAUREL, C. Aquaporins and water permeability of plant membranes, Annu. Rev. Plant Physiol. **Plant Molecular Biology**, 1997, v.48, p. 399-420.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 1987, v. 4, p. 406-425.

SAKURAI, J.; FUMIYOSHI, I.; TOMOYA, Y.; MATSUO, U.; MASAYOSHI, M. Identification of 33 Rice Aquaporin Genes and Analysis of Their Expression and Function. **Plant Cell Physiology**, 2005, v. 46, p. 1568-1577.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, 2007, v. 24, p. 1596-1599.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genomics-assisted breeding for crop improvement. **Trends in Plant Science**, 2005, v.10, p. 621-630.

WILSON, A. W.; HARRINGTON, S. H.; WOODMAN, W. L.; LEE, M.; SORRELLS, M. E.; MCCOUCH, S. R. Inferences on the Genome Structure of Progenitor Maize Through Comparative Analysis of Rice, Maize and the Domesticated Panicoids. **Genetics**, 1999, v. 153, p. 453–473.