

CARACTERIZAÇÃO DE RBOHs EM *FRAGARIA* x *ANANASSA*

GUSTAVO HENRIQUE CAMOZATTO¹; PEDRO LOPES REISER²; BRUNA TRINDADE PAIM³; HUGO CARLOS BOLZON GONZALEZ⁴; VITÓRIA HIRDES GLENZEL⁵; VANESSA GALLI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – gustavocamozatto@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – reisser.pedro@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – brunapaim@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – hugocarlos.bg@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – vitoriaglenzel@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – vane.galli@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Em virtude de suas características sensoriais agradáveis, o morango possui uma alta demanda, tornando-o uma cultura importante para a economia. O cultivo do morangueiro é suscetível ao estresse hídrico, por apresentar sistema radicular pouco profundo, folhas extensas e frutos com alta proporção de água, o que gera uma alta demanda pelo recurso (HAYASHI et al. 2008). Além disso, outro desafio enfrentado pela cultura, é o estresse salino, que da mesma forma que o estresse hídrico, resultam da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Essas moléculas são altamente instáveis e reativas, e em quantidades elevadas podem ocasionar um estresse oxidativo, lesando componentes importantes para o funcionamento celular. Entretanto, EROs tem sido sugeridos como importantes sinalizadores vegetais na interação entre a planta e diferentes estresses bióticos e abióticos. As mesmas são capazes de desencadear uma resposta local e sistêmica no organismo vegetal, modulando seu metabolismo por meio de uma cascata de sinalização que culminará na regulação da expressão gênica (CHOI et al. 2017).

Portanto a planta necessita ajustar os níveis citoplasmáticos de EROs para que atuem de fato como sinalizadores. Para tal, os organismos vegetais possuem em seu genoma isoformas de enzimas especializadas na produção de espécies reativas de oxigênio, as RBOHs (*respiratory burst oxidase homolog*).

Essas proteínas são nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases localizadas na membrana plasmática da célula e na membrana de organelas, de órgãos específicos, como folhas e raízes. As RBOHs possuem domínios EF-hand de ligação a cálcio; domínios transmembrana; e domínios de ligação a FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e NADPH, responsáveis pela produção de superóxido e peróxido de hidrogênio. Dada a importância dessa enzima para os organismo vegetais associada à escassez de sequências específicas descritas para morango, o presente estudo tem como objetivo identificar e caracterizar possíveis sequências gênicas que codifiquem para RBOHs em morango.

2. METODOLOGIA

Sequências de genes *Rboh* das espécies *Rosa chinensis*, *Pyrus x bretschneideri*, *Prunus persica*, *Prunus avium*, *Malus domestica*, *Fragaria x ananassa*, *Fragaria vesca* e *Arabidopsis thaliana* (Tabela 1) foram buscadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e utilizadas como referência na ferramenta MultiBlast, do programa CLC Genomics Workbench 10 – Quiagen®, em

contraste com o transcriptoma de morango descrito em Galli et al. (2018), no intuito de identificar sequências homólogas nesta espécie.

Tabela 1. Genes utilizados como iscas para busca de contigs de *Rboh* de morango presentes no transcriptoma 'in house'

Espécie	Inscrição NCBI
<i>Rosa chinensis</i>	>XM_024337313.1
<i>Pyrus x bretschneideri</i>	>XM_009355207.2
<i>Pyrus x bretschneideri</i>	>XM_009361564.2
<i>Prunus persica</i>	>XM_007225300.2
<i>Prunus avium</i>	>XM_021971786.1
<i>Malus domestica</i>	>XM_008371371.3
<i>Fragaria x ananassa</i>	>KX583680.1
<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	>XM_004299153.2
<i>Fragaria x ananassa</i>	>KC433894.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_124485.3

As maiores contigs resultantes da pesca no transcriptoma foram submetidas ao ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) sob os parâmetros: Tamanho mínimo de ORF: 150 nucleotídeos; Código Genético: Universal; Códon Iniciador: Apenas ATG; Ignorar ORFs Sobrepostas: Não. Essa metodologia foi utilizada afim de identificar as possíveis fases de leitura aberta (tradução de *open reading frame* – ORF) para cada um dos contigs.

A maior fase de leitura aberta identificada para cada contig foi utilizada nas ferramentas SmartBlast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/smartblast/smartBlast.cgi>) e BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para analisar a existência de domínios proteicos conservados, bem como buscar identificar superdomínios de famílias proteicas em comparação com as sequências já depositadas nos bancos de dados do NCBI.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando a metodologia descrita anteriormente, foi possível identificar, no total, quatro prováveis sequências codificadoras de RBOH em morango: CL5561Contig1; CL5398Contig2; CL5398Contig1 e CL654Contig3. Ao submeter as contigs ao ORFfinder foi possível obter os dados relativos as maiores ORFs de cada contig, sendo observado que a contig CL5398Contig1 possui a maior ORF, com 2808 nucleotídeos, correspondendo a uma proteína de 935 aminoácidos, enquanto a contig CL654Contig3 possui a menor ORF, com 1962 nucleotídeos, correspondendo a uma proteína de 653 aminoácidos. Assim também foi destacado que as contigs CL5398Contig2; CL5398Contig1 e CL654Contig3 possuíam estrutura inversa, tendo suas ORFs em sentido anti-senso (Tabela 2).

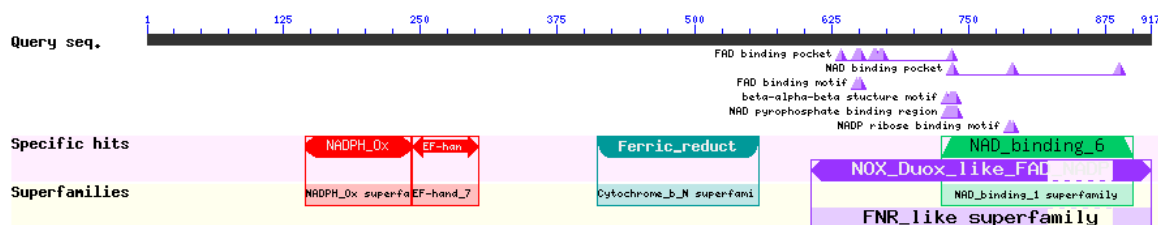
Tabela 2. Contigs do transcriptoma com suas respectivas maiores ORFs

CONTIG	ORF ¹	INÍCIO	FIM	NT ²	AA ³
CL5561Contig1	+1	103	2856	2754	917
CL5398Contig2	-1	2819	99	2721	906
CL5398Contig1	-1	3334	527	2808	935
CL654Contig3	-2	2790	829	1962	653

¹Open Read Frame; ²Nucleotídeo; ³Aminoácidos.

A sequência de aminoácidos verificada para a maior ORF de cada um dos contigs foi inserida na ferramenta SmartBlast, onde foi possível analisar uma alta similaridade com outros acessos de RBOH depositados no banco, bem como verificar possíveis domínios conservados no sumário gráfico. Expandindo os resultados, foi possível constatar que, para todas as quatro contigs analisadas, os domínios NADPH Oxidase e EF-hand estavam presentes, como ilustrado na Figura 1, referente ao contig CL5561Contig1.

Figura 1. Ilustração dos grupamentos dos domínios NADPH_Ox e EF-hand presentes na maior ORF da contig CL15525Contig1.



4. CONCLUSÕES

No presente trabalho, a estratégia utilizada permitiu identificar possíveis sequências de *FaRBOH* no transcriptoma 'in house' disponível. Embora a metodologia utilizada tenha sido eficaz em realizar tal identificação, é necessário refinar a mesma afim de analisar outras sequências presentes no banco de dados. Assim sendo, ensaios biológicos se mostram necessários para especificar as funções das diferentes isoformas em diferentes tecidos vegetais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HAYASHI, A. H.; VOLPE, A.; KLUGE, R. A. **Morangueiro**. 2008.

CHOI, W.; MILLER, G.; WALLACE, I.; HARPER, J.; MITTLER, R. Orchestrating Rapid Long-Distance Signaling in Plants with Ca²⁺, ROS, and Electrical Signals. , 2017.

KAUR, G.; GURUPRASAD, K.; TEMPLE, B. R. S.; et al. Structural complexity and functional diversity of plant NADPH oxidases. **Amino Acids**, 2017. Springer Vienna.

MARTÍNEZ-FERRI, E.; SORIA, C.; ARIZA, M. T.; et al. Water relations , growth and physiological response of seven strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch .) to different water availability. **Agricultural Water Management**, v. 164, p. 73–82, 2016.

CORPAS, F. J.; GUPTA, D. K. Production Sites of Reactive Oxygen Species (ROS) in Organelles from Plant Cells. , p. 1–22, 2015.