

CDPKs em *Fragaria×ananassa*: identificação e caracterização da expressão gênica em plantas submetidas a estresses abióticos

Audrey Christina do NASCIMENTO:¹ Hugo Carlos Bolzon², Pedro Reisser³,
Rosane Crizel⁴, Ellen Cristina Perin⁵, Vanessa GALLI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – audreydadycn@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – hugocarlos.bg@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – _reisser.pedro@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – _rosanecrizel1@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – ellenperin@hotmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

O cálcio (Ca^{2+}) é um mensageiro secundário de suma importância nas plantas, desempenha diversas funções, variando conforme o estímulo e fase de desenvolvimento das plantas. Algumas proteínas atuam como sensores do Ca^{2+} , conferindo especificidade e atuando em resposta a estímulos de sinalização. Entre essas proteínas, estão as proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs), que são codificadas por famílias multigênicas e desempenham diversas funções. Por exemplo, através de variações na concentração do íon Ca^{2+} nas células, as CDPKs são sensibilizadas resultando na fosforilação de compostos alvo (WANG, 2016).

As CDPKs vem sendo relatadas por serem fatores essenciais na regulação da tolerância das plantas frente a situações de estresses bióticos e abióticos. Em alguns casos, essa regulação vem acompanhada da modulação da sinalização de ácido abscísico (ABA), do aumento no conteúdo de compostos antioxidantes e consequente redução do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ASANO et al., 2012).

As CDPKs são formadas por cinco domínios: um domínio N-terminal variável que tem sido sugerido como determinante da localização celular da proteína; um domínio quinase, responsável pela fosforilação dos compostos alvo; um domínio autoinibitório; um domínio de ligação ao Ca^{2+} ; e um pequeno domínio C-terminal (WANG, 2016).

Uma vez que apenas duas sequências gênicas que codificam para CDPKs em *Fragaria×ananassa* foram identificadas até o presente momento, e que o papel dessas enzimas ainda é pouco elucidado nesta espécie, este estudo tem como objetivo identificar possíveis sequências codificadoras de CDPKs e caracterizar o perfil de expressão em frutos de morango submetidos a estresses abióticos.

2. METODOLOGIA

2.1. Identificação de sequências codificadoras de CDPKs de morango

Inicialmente, um banco de transcritos 'in house', previamente obtido através de sequenciamento Illumina HighSeq2000 a partir de frutos de morango, foi utilizado para a busca de sequências codificadoras de CDPKs em morango. Para tanto, estes transcritos foram submetidos ao processo de anotação utilizando sequências não redundantes do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), e do banco de dados do Swiss-prot (<http://www.expasy.ch/sprot/>), aplicando o programa BLASTX (e-value<1e-6).

As sequências putativas identificadas foram traduzidas em peptídeos a partir do maior fase de leitura (do inglês, *open reading frame*, ORF) utilizando a ferramenta ORFfinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Esta sequência peptídica foi utilizada para verificar a presença dos domínios clássicos de proteínas CDPKs, utilizando a ferramenta PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>).

2.2. Avaliação da expressão das sequências CDPKs identificadas em morangos submetidos a estresses abióticos

Para avaliação da expressão das sequências codificadoras de CDPKs identificadas neste estudo, bem como das CDPKs já descritas na literatura (*FaCDPK1* e *FaCDPK2*), foram utilizadas amostras de frutos de morango 'Camarosa' coletados obtidas em experimento previamente realizado e descrito por Perin (2016), onde as plantas foram submetidas ou não a estresse hídrico ou estresse salino durante seu desenvolvimento. Estes frutos foram macerados com auxílio de nitrogênio líquido, e o RNA total extraído com o método CTAB modificado (MESSIAS et al., 2014). A quantificação do RNA extraído foi realizada pelo protocolo Qubit Quantitation Platform (Invitrogen™). Os produtos de extração de RNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TBE (Tris-ácido bórico-EDTA) com o corante GelRed™, com intuito de avaliar a qualidade do RNA extraído. A síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima transcriptase reversa M-MLV e oligo(dt), conforme fabricante (Invitrogen™).

Oligonucleotídeos sintéticos foram projetados com auxílio do programa Vector NTI11 (Invitrogen) de modo a produzir amplicons com tamanhos entre 100 e 250 pares de bases e visando uma temperatura de hibridização em torno de 60 °C. A expressão dos genes foi avaliada através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), utilizando a metodologia descrita em Galli et al. (2016). Para os cálculos de expressão relativa dos genes, foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando os genes *PIRUV* (piruvato decarboxilase), *DBP* (proteína ligadora de DNA) e *H4* (histona H4), de acordo com Galli et al. (2014).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo, foi possível a identificação de nove possíveis sequências CDPKs em *F. ananassa*, sendo que a maior apresenta 600 aminoácidos (*FaCDPK8*), enquanto que a menor apresenta 351 aminoácidos (*FaCDPK9*). Todas as sequências identificadas correspondem à sequência completa da proteína e apresentaram pelo menos um domínio quinase e um domínio *EF-hand*, como demonstrado na Tabela 1.

Em *F. ananassa*, apenas duas sequências codificadoras de CDPKs haviam sido identificadas até o momento. *FaCDPK1* apresenta variação nos níveis de transcritos de acordo com o tecido e mediante a exposição a estresse por frio (LLOP-TOUS et al., 2002), enquanto que *FaCDPK2* apresenta expressão mais significativa em tecidos florais (ZHANG et al., 2011).

Diante do número limitado de sequências CDPKs caracterizadas em morango, neste estudo o perfil transcricional das nove sequências putativas de CDPKs identificadas foi avaliado em frutos de morango submetidos ou não a estresse hídrico ou salino (Tabela 2). Os resultados mostram que *FaCDPK4*, *FaCDPK5*, *FaCDPK8*, *FaCDPK9* e *FaCDPK11* apresentaram aumento de transcrição em ambos os tratamentos, enquanto que *FaCDPK6* e *FaCDPK7* reduziram seus níveis transcricionais em ambos os tratamentos, sugerindo que

estas sequências apresentam papel na resposta a estresses osmóticos. Por outro lado, algumas cópias mostraram efeito dependente do tipo de estresse reconhecido pela planta, uma vez que *FaCDPK1* apresentou aumento de expressão nos frutos submetidos a estresse hídrico e redução nos frutos submetidos a estresse salino; e *FaCDPK3* e *FaCDPK10* aumentaram a expressão apenas mediante estresse hídrico, enquanto que *FaCDPK2* apenas mediante estresse salino. Além disso, é possível observarmos que a cópia com maiores níveis de expressão nos frutos de ambos tratamentos foi a *FaCDPK4*, descrita pela primeira vez no presente estudo, representando um alvo promissor para o desenvolvimento de uma planta geneticamente modificada tolerante a estresses osmóticos.

Tabela 1. Informações sobre as sequências de *CDPKs* identificadas em *F. ananassa*

Nome	Contig	Tamanho (aa)*	Posição inicial (aa)*	Posição final (aa)*	Domínios quinase	Domínios EF-hand
FaCDPK3	CL14contig12	451	686	1137	1	1
FaCDPK4	CL3033contig1	541	353	894	1	4
FaCDPK5	CL3670contig1	562	173	735	1	4
FaCDPK6	CL3928contig1	547	150	697	1	4
FaCDPK7	CL4123contig1	545	190	735	1	4
FaCDPK8	CL5105contig1	600	191	791	1	1
FaCDPK9	CL5393contig2	351	442	794	1	4
FaCDPK10	CL6644contig2	519	191	710	1	4
FaCDPK11	Locus_4415_ Transcript6/14	544	149	693	1	4

* aa - aminoácidos

Tabela 2. Acúmulo relativo das *CDPKs* identificadas em morangos submetidos a estresse hídrico ou salino. Os valores de quantificação relativa estão expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Nome	Tratamentos		
	Controle	Estresse hídrico	Estresse salino
FaCDPK1	1 $\pm$ 0.03 b	1.28 $\pm$ 0.09 a	0.21 $\pm$ 0.01 c
FaCDPK2	1 $\pm$ 0.02 b	1.14 $\pm$ 0.06 b	1.89 $\pm$ 0.06 a
FaCDPK3	1 $\pm$ 0.03 b	4.65 $\pm$ 0.22 a	1.26 $\pm$ 0.11 b
FaCDPK4	1 $\pm$ 0.03 b	5.13 $\pm$ 0.29 a	4.57 $\pm$ 0.11 a
FaCDPK5	1 $\pm$ 0.02 c	2.69 $\pm$ 0.04 a	1.18 $\pm$ 0.02 b
FaCDPK6	1 $\pm$ 0.01 a	0.26 $\pm$ 0.02 b	0.13 $\pm$ 0.01 c
FaCDPK7	1 $\pm$ 0.01 a	0.43 $\pm$ 0.01 b	0.26 $\pm$ 0.01 c
FaCDPK8	1 $\pm$ 0.005 b	2.71 $\pm$ 0.09 a	2.76 $\pm$ 0.12 a
FaCDPK9	1 $\pm$ 0.01 c	2.39 $\pm$ 0.04 a	1.48 $\pm$ 0.03 b
FaCDPK10	1 $\pm$ 0.01 c	1.72 $\pm$ 0.14 a	1.12 $\pm$ 0.03 b
FaCDPK11	1 $\pm$ 0.02 b	3.22 $\pm$ 0.18 a	2.52 $\pm$ 0.16 b

Médias acompanhadas por letras diferentes na coluna, diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

4. CONCLUSÕES

Este estudo possibilitou a identificação de nove novas cópias da família gênica das *CDPKs* em *F. ananassa*, bem como a caracterização do acúmulo de mRNA em condições de estresse salino e hídrico. Futuros estudos permitirão

elucidar o papel das *FaCDPKs*, visando o desenvolvimento de frutos biofortificados e tolerantes ao estresse.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASANO, T. et al. A rice calcium-dependent protein kinase OsCPK12 oppositely modulates salt-stress tolerance and blast disease resistance. **Plant Journal**, v. 69, n. 1, p. 26–36, 2012.
- GALLI, V. et al. Validation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in strawberry fruits using different cultivars and osmotic stresses. **Gene**, v. 554, n. 2, p. 205–214, 2014.
- GALLI, V., BOROWSKI, J. M., PERIN, E. C., MESSIAS, R. S., LABONDE, J., PEREIRA, I. S., ROMBALDI, C.V. Validation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in strawberry fruits using different cultivars and osmotic stresses. **Gene**, v. 554, p. 205-214, 2015.
- LLOP-TOUS et al. Characterization of a strawberry cDNA clone homologous to calcium-dependent protein kinases that is expressed during fruit ripening and affected by low temperature. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 378, p. 2283-5, 2002.
- MESSIAS, R.S. et al. Isolation of high-quality RNA from grains of different maize varieties. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n.7, p. 697-707, 2014.
- PERIN, Ellen Cristina. **Drought and salt stress as biofortification strategies in strawberry**. 2017. 180p. Thesis (Doctorate Degree in Food Science and Technology).
- WANG, J. et al. Calcium-dependent protein kinase (CDPK) and CDPK-related kinase (CRK) gene families in tomato: genome-wide identification and functional analyses in disease resistance. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 291, p. 661–676, 2016.
- ZHANG, J. et al. Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) during fruit development and maturation. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 3, p. 1103–1118, 2011.