



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS **SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2025**

Caracterização molecular do gene *DIHIDROXIFLAVONOL-4-REDUTASE (DFR)* **em espécies brasileiras de *Cattleya* (Orchidaceae)**

Elen Monick Gomes dos Santos¹; Carlos Hernán Barrera Rojas², Cassio Van Den Berg²

1. Elen Monick Gomes dos Santos, PIBIC/CNPq, CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, e-mail: elenmonickgomes@gmail.com

2. Carlos Hernán Barrera Rojas,

3. Cassio Van Den Berg, DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, e-mail: vcassio@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: uma; duas; três

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae, uma das maiores e mais complexas entre as angiospermas, apresenta mais de 25.000 espécies descritas (Atwood, 1986), sendo amplamente reconhecida por suas flores vistosas e pela importância ecológica e econômica (Suzuki, 2014; Van den Berg, 2023). O gênero *Cattleya*, que reúne cerca de 120 espécies — aproximadamente 100 delas nativas do Brasil (Flora e Funga do Brasil, 2024) — destaca-se pela intensa diversidade de cores nas inflorescências (Govaerts et al., 2018). Essa variação é atribuída principalmente à presença de antocianinas, pigmentos hidrossolúveis da classe dos flavonoides que atuam na fotoproteção e na atração de polinizadores (Hughes et al., 2021; Barrera-Rojas, 2024). A biossíntese das antocianinas ocorre por uma via metabólica conservada em plantas terrestres, e a enzima *Dihydroflavonol-4-Redutase (DFR)* desempenha papel central nesse processo, convertendo dihydroflavonoides em leucoantocianidinas (Grotewold, 2006; Li et al., 2020). Em *Cattleya*, o gene DFR ainda não foi caracterizado molecularmente; assim, sua amplificação e sequenciamento podem ajudar a entender a produção dos pigmentos florais.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

Foram utilizadas amostras de folhas e flores de espécies de *Cattleya* do banco de germoplasma do LAMOL/UEFS. O RNA total foi extraído de tecidos florais pigmentados utilizando o reagente Quick-Zol (Trizol, Ludwig Biotec), seguindo o protocolo do fabricante, com adaptações para minimizar a interferência de metabólitos secundários característicos de orquídeas, incluindo duas lavagens adicionais do pellet com isopropanol. Após a extração, o RNA foi ressuspensão em 20 µL de água livre de nucleases (RNase-free) e armazenado a -80 °C até o uso. A integridade do material foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1X, utilizando o corante intercalante Diamond, sob tensão de 100 V por 35 minutos. O DNA foi extraído pelo método CTAB. A integridade foi avaliada em gel de agarose 1% com GelRed®, enquanto pureza e concentração foram determinadas por espectrofotometria.

A PCR para amplificação do gene *DFR* utilizou primers baseados na sequência do gene *DFR* de um híbrido de *Cattleya* (GenBank KP171694.1). O protocolo inicial consistiu em pré-aquecimento a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 50 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min, finalizando com extensão a 72 °C por 5 min. Para otimizar, o tempo de extensão foi prolongado para 3 min. em 40 ciclos e posteriormente reduzido para 2 min. As reações foram preparadas com 1x Green GoTaq Master mix, 0,1 µM de cada primer e 50 ng de DNA. Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1%, purificados com PEG 20% e enviados para sequenciamento Sanger.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

A extração de RNA de tecidos florais pigmentados das espécies de *Cattleya* apresentou limitações devido à presença de metabólitos secundários, como polifenóis e polissacarídeos, que aumentaram a viscosidade das amostras e formaram agregados gelatinosos, dificultando a solubilização e manipulação do material. As análises espectrofotométricas indicaram concentrações entre 41,5 e 83,3 ng/µL, com razões A260/280 adequadas, mas A260/230 inferiores a 2,0, sugerindo contaminação residual. No gel de agarose, foram visualizadas bandas correspondentes ao RNA ribossômico 28S e 18S, embora a banda 28S apresentasse menor intensidade em algumas amostras, indicando degradação parcial. Essas interferências inviabilizaram etapas subsequentes como síntese de cDNA e RT-PCR, destacando a necessidade de protocolos específicos para tecidos florais pigmentados de orquídeas.

A caracterização estrutural preliminar do gene *DFR* por meio de DNA genômico revelou diferenças na ORF (Open Reading Frame) e na posição e tamanho dos íntrons entre as espécies analisadas. Em *C. labiata* e *C. aclandiae*, a ORF apresentou 1050 pb, com um íntron próximo ao final da sequência codificante (113 pb e 121 pb, respectivamente), evidenciando conservação estrutural e possível pressão seletiva purificadora. Em contraste, *C. tenuis* e *C. warneri* apresentaram ORFs menores (436 pb e 429 pb) com íntrons localizados em regiões mais iniciais (114 pb e 113 pb), indicando maior diversidade estrutural do gene *DFR* dentro do gênero. As variações observadas podem influenciar o processamento do RNA, incluindo splicing, estabilidade do transcrito e eficiência da tradução, refletindo adaptações evolutivas específicas de cada espécie.

No geral, os resultados sugerem que, apesar das diferenças na arquitetura gênica, a região codificante do gene *DFR* é relativamente conservada em *Cattleya*, preservando funções essenciais na biossíntese de antocianinas. Esses dados fornecem uma base para estudos futuros voltados à caracterização funcional do gene e à compreensão da variação genética de pigmentos florais neste gênero.

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

Neste trabalho, ficou evidenciada a dificuldade de obtenção de RNA íntegro a partir de tecidos florais pigmentados de espécies de *Cattleya*, devido à presença de polifenóis e

polissacarídeos que comprometeram a solubilidade e integridade das amostras. Apesar dessas limitações, a extração de DNA genômico foi bem-sucedida, permitindo a caracterização estrutural do gene DFR. Observou-se conservação estrutural em *C. labiata* e *C. aclandiae*, enquanto *C. tenuis* e *C. warneri* apresentaram maior diversidade de ORFs e íntrons, sugerindo adaptações evolutivas específicas. De modo geral, o gene DFR apresenta arranjo relativamente estável no gênero, indicando preservação de sua função na biossíntese de antocianinas, mas reforçando a necessidade de protocolos otimizados de extração de RNA para futuras análises funcionais.

REFERÊNCIAS

Atwood, J.T. (1986). **The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids.** *Selbyana*, Vol. 9, No. 1: 171-186.

Barrera-Rojas, C. H., Nogueira, F. T. S., & van den Berg, C. (2024). **Painting the plant body: pigment biosynthetic pathways regulated by small RNAs.** *The New phytologist*, 10.1111/nph.20287.

Griesbach, R.J. (2005). **Biochemistry and genetics of flower color.** *Plant Breeding Reviews*, Vol. 25:89–114.

Grotewold, E. (2006). **The genetics and biochemistry of floral pigments.** *Annual review of plant biology*, 57, 761–780. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105248>

Hughes, N. M., Connors, M. K., Grace, M. H., Lila, M. A., Willans, B. N., & Wommack, A. J. (2021). **The same anthocyanins served four different ways: Insights into anthocyanin structure-function relationships from the wintergreen orchid, *Tipularia discolor*.** *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, 303, 110793. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110793>

Li, B. J., Zheng, B. Q., Wang, J. Y., Tsai, W. C., Lu, H. C., Zou, L. H., Wan, X., Zhang, D. Y., Qiao, H. J., Liu, Z. J., & Wang, Y. (2020). **New insight into the molecular mechanism of colour differentiation among floral segments in orchids.** *Communications biology*, 3(1), 89. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0821-8>

Suzuki RM (2014) **Breve análise sobre o comércio exterior de orquídeas no Brasil.** *Trabalhos do 21 Reunião Anual do Instituto de Botânica: Inovação Ciência e Sociedade São Paulo.*

van den Berg, C. (2023). *Cattleya*. In: *Flora e Funga do Brasil*. Disponível em <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB11340>. Acesso em 06 de Novembro de 2023.