



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

XXVIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS **SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2024**

Sequenciamento e filogenia do gene DFR (Dihidroflavonol-4-redutase) em espécies selecionadas do gênero *Cattleya*

Elen Monick Gomes dos Santos¹; Carlos Hernán Barrera-Rojas²; Cássio van den Berg³

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: Elenmonickgomes@gmail.com
2. Co-orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: carlos.barrera@unesp.br
3. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: vcassio@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Orquídeas, Orchidaceae, pigmentos florais

INTRODUÇÃO

Neste estudo, foram analisadas sequências genéticas de espécies dos gêneros *Cattleya*, *Guarianthe* e *Brassavola* para investigar suas relações evolutivas e padrões de conservação genômica em relação a genes de pigmentos florais. Foram realizadas análises moleculares e sequenciamento de DNA de regiões do DNA genômico, e os dados obtidos foram comparados com genomas de referência, como o de *Dendrobium catenatum* (Li et al. 2020) e *Phalaenopsis equestris* (Cai et al. 2014). O objetivo principal foi identificar e classificar as sequências genéticas do gene DFR (dihidroflavonol-4-redutase), analisar suas similaridades e diferenças, e compreender a relevância dessas descobertas para o estudo das orquídeas.

Além disso, a amplificação do gene **DFR**, envolvido na biossíntese de antocianinas e, portanto, importante para a coloração das flores, foi realizada com o objetivo de obter informações sobre a expressão e variabilidade desse gene entre as espécies estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

Para o estudo, folhas de 18 espécies dos gêneros *Cattleya*, *Brassavola*, *Guarianthe* e *Rhyncholaelia* foram preservadas em gel CTAB e o DNA extraído com o protocolo de 2X CTAB. O protocolo de PCR utilizou primers desenhados com base em uma sequência de DFR disponível no Genbank, e incluiu: pré-aquecimento a 95 °C por 5 minutos, desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 50 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 45 segundos, e extensão final a 72 °C por 5 minutos, totalizando 35 ciclos. O mix de PCR incluiu Taq DNA Polimerase (5 U/μL, 7,5 μL), água (3,5 μL), primers (1,5 μL cada) e 1 μL de DNA da amostra.

Após a amplificação e quantificação por PCR, bandas de cerca de 500 bp foram purificadas com PEG, descrito por Scharlau, McKeown e Johnson (2020) e enviadas para sequenciamento Sanger na Fiocruz Bahia. As sequências produzidas foram processadas com os módulos Pregap4 e Gap4 do software Staden 1.6. (Staden et al.,

2000; Bonfield et al., 1995). e agrupadas por similaridade após alinhamento com o software MAFFT dentro do pacote Bioedit: Grupo 1 (4 sequências altamente similares), Grupo 2 (5 sequências altamente similares) e Grupo 3 (sequências únicas e com baixa similaridade com os grupos anteriores). As sequências de *Cattleya warneri* não puderam ser processadas devido a falhas no sequenciamento. As sequências do grupo 1 e grupos 2, foram submetidas às análises filogenéticas usando Máxima Verossimilhança, no programa IQTREE2.

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

Foram realizadas análises moleculares e sequenciamento de amostras de folhas preservadas em gel CTAB de 18 espécies dos gêneros *Cattleya*, *Guarianthe* e *Brassavola* na Fiocruz Bahia. As sequências obtidas foram agrupadas em três categorias com base na similaridade, analisadas usando o software Muscle no Bioedit:

1. **Grupo 1:** Sequências altamente semelhantes, incluindo *Cattleya nobilior* var. *amaliae*, *Cattleya pfisteri*, *Cattleya lueddemanniana*, e *Cattleya forbesii*.
2. **Grupo 2:** Sequências altamente semelhantes, com *Cattleya sincorana* (sequência 2), *Cattleya warscewiczii*, *Cattleya intermedia*, e *Guarianthe hennisiana* (sequência 2).
3. **Grupo 3:** Sequências sem similaridade significativa com os grupos anteriores, incluindo *Cattleya gaskelliana*, *Brassavola nodosa*, *Cattleya bicolor*, *Cattleya aurea*, *Cattleya sincorana*, *Cattleya loddigesii*, *Guarianthe hennisiana*, *Cattleya trianae*, *Cattleya purpurata*, e *Guarianthe bowringiana*.

A espécie *Cattleya warneri* não foi agrupada devido a falhas no sequenciamento, apesar da purificação dos produtos de PCR.

No primeiro grupo de espécies com sequências altamente semelhantes, a análise WGS revelou correspondências com o genoma de *Dendrobium catenatum*, sugerindo conservação genômica ou proximidade evolutiva. Essas espécies compartilham regiões genômicas conservadas, mas as sequências não estão relacionadas ao gene DFR. A filogenia das 4 espécies foi inesperada em relação às filogenias conhecidas do gênero, possivelmente devido à amostragem limitada.

No segundo grupo, a técnica WGS também mostrou várias correspondências com *Dendrobium catenatum*, indicando uma relação evolutiva mais estreita ou uma ampla conservação genética. As amostras, compostas por 5 sequências de 3 gêneros diferentes, apresentaram uma filogenia peculiar em comparação com dados publicados, o que pode ser atribuído à amostra pequena.

Ao analisar as sequências individualmente do terceiro grupo, observou-se que a *Cattleya gaskelliana* apresentou correspondência parcial com um fragmento do genoma de *Phalaenopsis equestris*, a primeira orquídea com genoma completo sequenciado, mas a sequência não foi totalmente caracterizada.

A *Brassavola nodosa* mostrou homologia com genes de *Dendrobium catenatum* e *Phalaenopsis equestris*, indicando uma conservação genômica e funções semelhantes entre essas espécies.

A análise da *Cattleya bicolor* revelou um alinhamento com um locus não caracterizado do genoma de *Phalaenopsis*, sugerindo que essa região pode conter elementos genéticos menos estudados, como regiões não codificantes, porém a presença de mRNA correspondente indica que a região é codificante, apesar da função exata ainda não estar completamente clara.

Foi identificada uma sequência de 40 pb de *Guarianthe hennisiana* com similaridade a um fragmento de mRNA e a um locus não caracterizado no genoma de *Dendrobium catenatum*. A presença do fator de transcrição WRKY no locus não caracterizado sugere que certos genes ou processos biológicos podem ser conservados entre essas espécies.

A *Cattleya aurea* mostrou alinhamento com um fragmento de ncRNA no genoma de *Dendrobium catenatum*, o que pode ajudar a investigar o papel dos elementos não codificantes na regulação gênica das orquídeas.

A sequência de *Cattleya purpurata* não apresentou homologia com sequências no GenBank e revelou apenas DNA repetitivo, possivelmente único para seu genoma, dificultando comparações.

Na *Guarianthe bowringiana*, foram encontrados DNA repetitivo semelhante ao de *Dendrobium catenatum*, indicando regiões genômicas compartilhadas.

Cattleya sincorana, *Cattleya loddigesii* e *Cattleya trianae* não apresentaram similaridade com os genomas disponíveis no GenBank, o que pode indicar falta de dados ou divergência genética.

As análises de PCR mostraram que o gene DFR tem cerca de 1100 bp, com amplificação a partir de cDNA devido à presença de introns. O gene DFR de *C. intermedia* tem 1053 bp e 96% de identidade com a sequência de referência, refletindo mutações específicas da espécie e ressaltando a importância de estudar genes de pigmentação floral para pesquisas em *Cattleya*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

O estudo identificou sequências genéticas de espécies dos gêneros *Cattleya*, *Guarianthe* e *Brassavola* que têm semelhanças com o genoma de *Dendrobium catenatum*, refletindo uma alta conservação dentro da família Orchidaceae. Comparações com genes do gênero *Phalaenopsis* também mostraram correspondências e relações evolutivas entre as espécies analisadas. No entanto, não foi possível obter sequências do gene DFR (dihidroflavonol 4-redutase) a partir de DNA genômico devido às limitações das técnicas de biologia molecular usadas, que não conseguiram amplificar o gene, possivelmente devido ao seu tamanho e à presença significativa de íntrons. As sequências amplificadas foram curtas e de baixa especificidade, frequentemente associadas a DNA repetitivo, o que dificultou a análise e interpretação dos dados. Alternativamente, foi testado outro protocolo baseado em RNA mensageiro, que conseguiu amplificar e sequenciar o gene DFR de *Cattleya intermedia*.

REFERÊNCIAS

Li, B-J et al (2020) New insight into the molecular mechanism of colour differentiation among floral segments in orchids. Comm Biol 3: 89.

Cai J et al (2014) The genome sequence of the orchid *Phalaenopsis equestris*. *Nat Genet* 47:65-72

Scharlau, K., McKeown, A., & Johnson, J. (2020). Polyethylene glycol (PEG) purification for nucleic acids. *Methods in Molecular Biology*

Staden, R., Beal, K., & Bonfield, J. K. (2000). The Staden package, 1998. *Methods in Molecular Biology*.