

Análises sobre a família gênica VIT em plantas e caracterização dos genes *OsVIT1* e *OsVIT2* por meio de transformação de levedura.

Carolina L. Martello, Paloma K. Menguer, Felipe K. Ricachenevsky, Karina L. Lopes, Janette P. Fett
Laboratório de Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica e Centro de Biotecnologia, Instituto de Biociências,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. E-mail: carolinamartello1@gmail.com

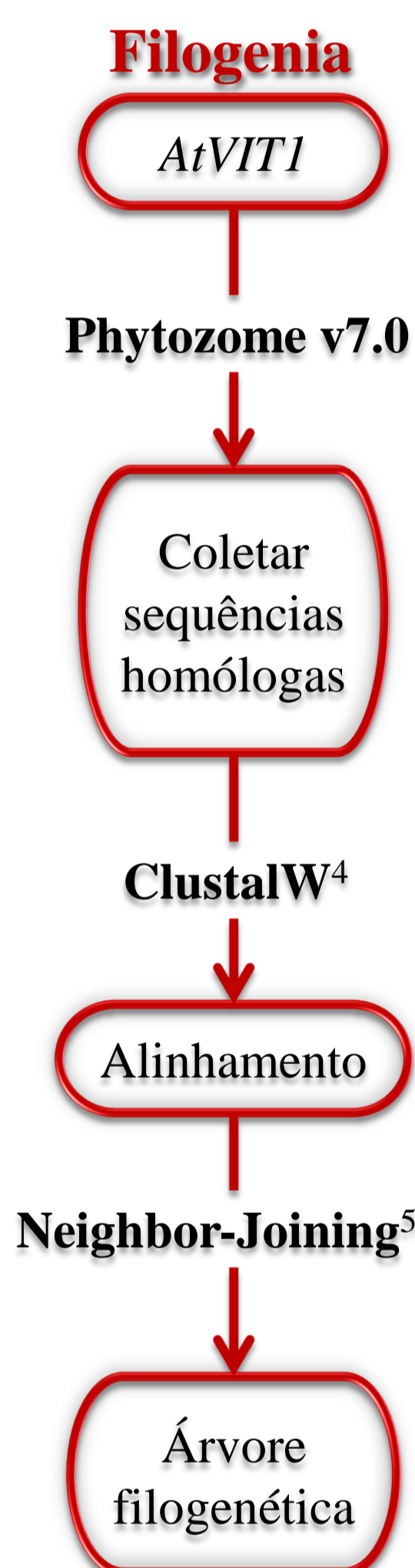
Introdução

O grão de arroz é pobre em micronutrientes, como o ferro, cuja deficiência afeta milhões de pessoas. Em *Arabidopsis thaliana* e *Tulipa gesneriana* foi demonstrado que o gene VIT1 (Vacuolar Iron Transporter 1) codifica uma proteína que transporta ferro para dentro do vacúolo dessas plantas. Em arroz, foram identificados dois genes da família VIT, *OsVIT1* e *OsVIT2*.¹⁻³

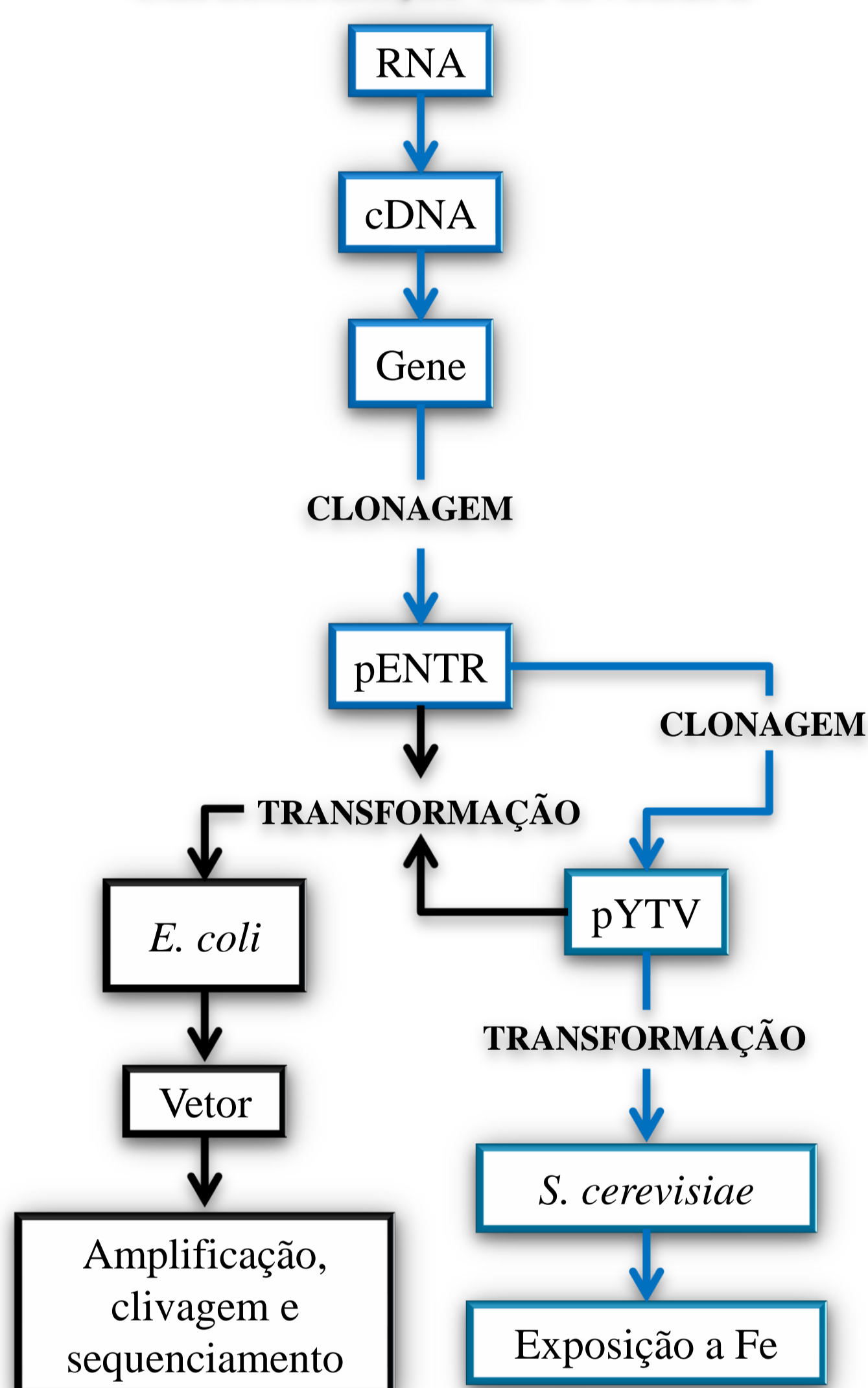
Objetivos

- analisar a distribuição de genes VIT em plantas;
- caracterizar os genes *OsVIT1* e *OsVIT2* por meio de expressão heteróloga de suas proteínas em levedura;

Metodologia



Caracterização em levedura



Resultados

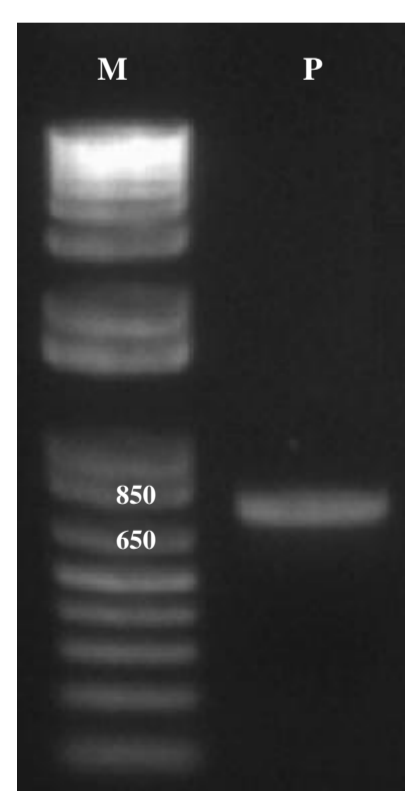


Figura 1: Eletroforese do resultado da purificação do cDNA de *OsVIT1* (741 pb); M indica o marcador de peso molecular e P o gene purificado entre as bandas 850 pb e 650 pb.

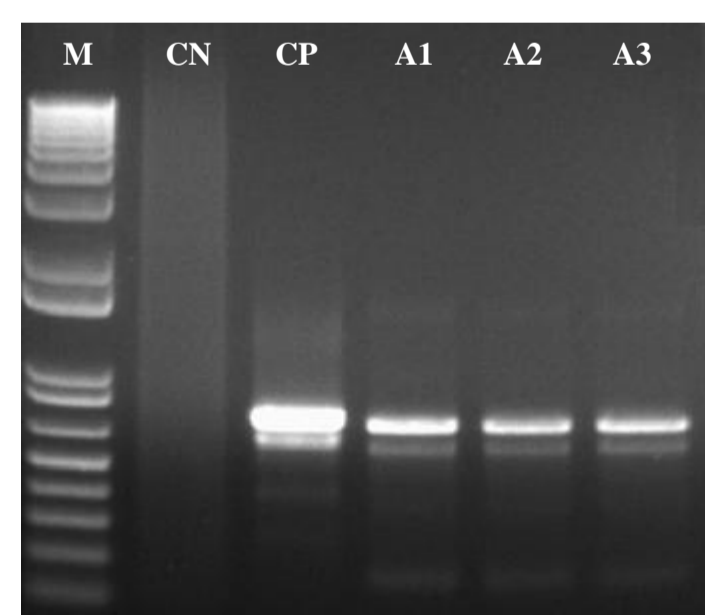


Figura 2: Eletroforese do resultado da reação de amplificação de *OsVIT1* em plasmídeos pENTR; M indica o marcador, CN indica o controle negativo, CP indica o controle positivo (gene isolado, Figura 1) e A1, A2 e A3 indicam diferentes amostras plasmidiais que contém o gene *OsVIT1*.

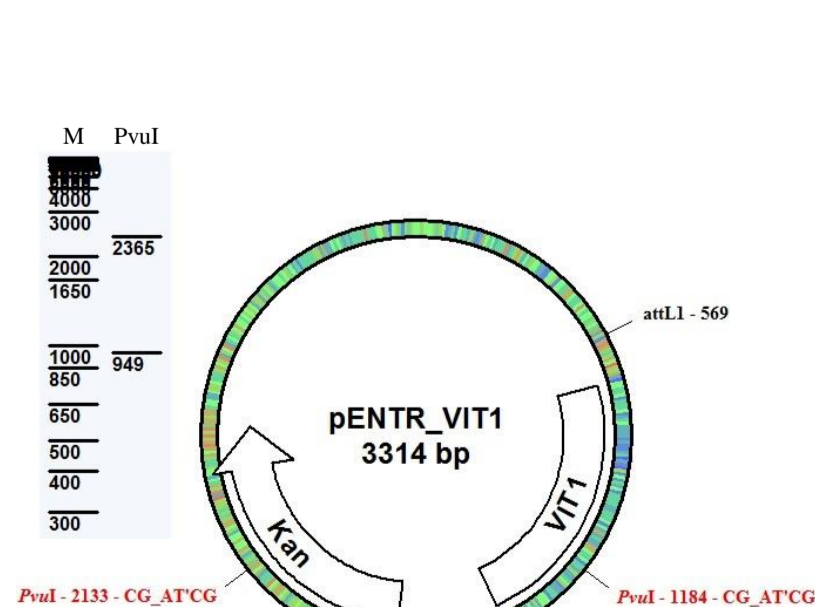


Figura 3: Mapa do vetor pENTR contendo *OsVIT1*, indicando sítios para a clivagem com a enzima de restrição PvuI, mostrando um sítio no interior do gene de resistência do vetor (Kan) e outro no interior do gene *OsVIT1*. Os fragmentos esperados são de 949 pb e de 2365 pb; a representação da eletroforese indica como os fragmentos dessa reação deveriam se posicionar em gel de agarose de mesma concentração e usando o mesmo marcador molecular (M) que os utilizados nas Figuras 4 e 5.

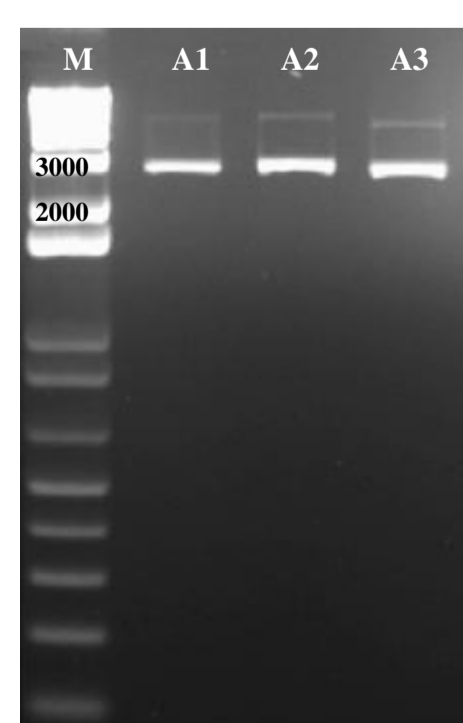


Figura 4: Eletroforese do resultado da clivagem do vetor pENTR com a enzima PvuI; M indica o marcador e A1, A2 e A3 indicam as diferentes amostras com uma banda entre 3000 pb e 2000 pb, diferente do esperado conforme Figura 3.

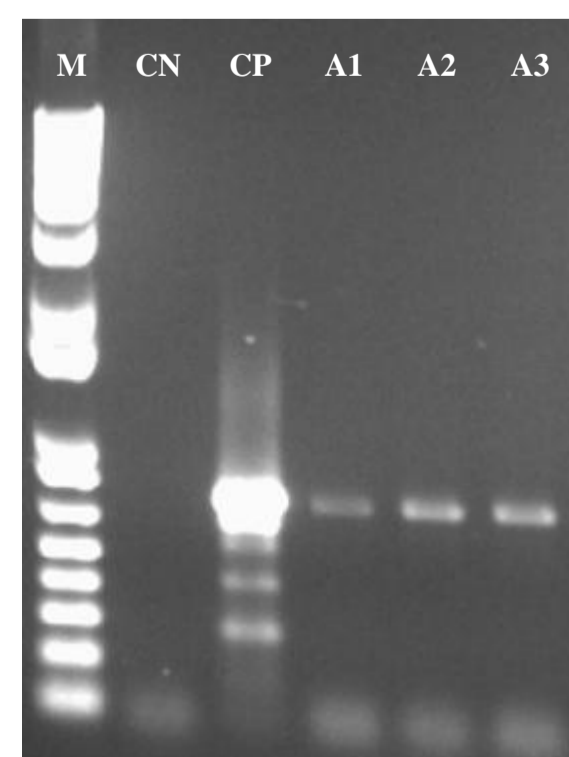


Figura 5: Eletroforese do resultado da reação de amplificação de *OsVIT1* a partir de DNA das amostras clivadas (Figura 4); M indica o marcador, CN indica o controle negativo, CP indica o controle positivo e A1, A2 e A3 indicam as diferentes amostras, que resultaram em amplificação de *OsVIT1* mesmo após a reação de clivagem.

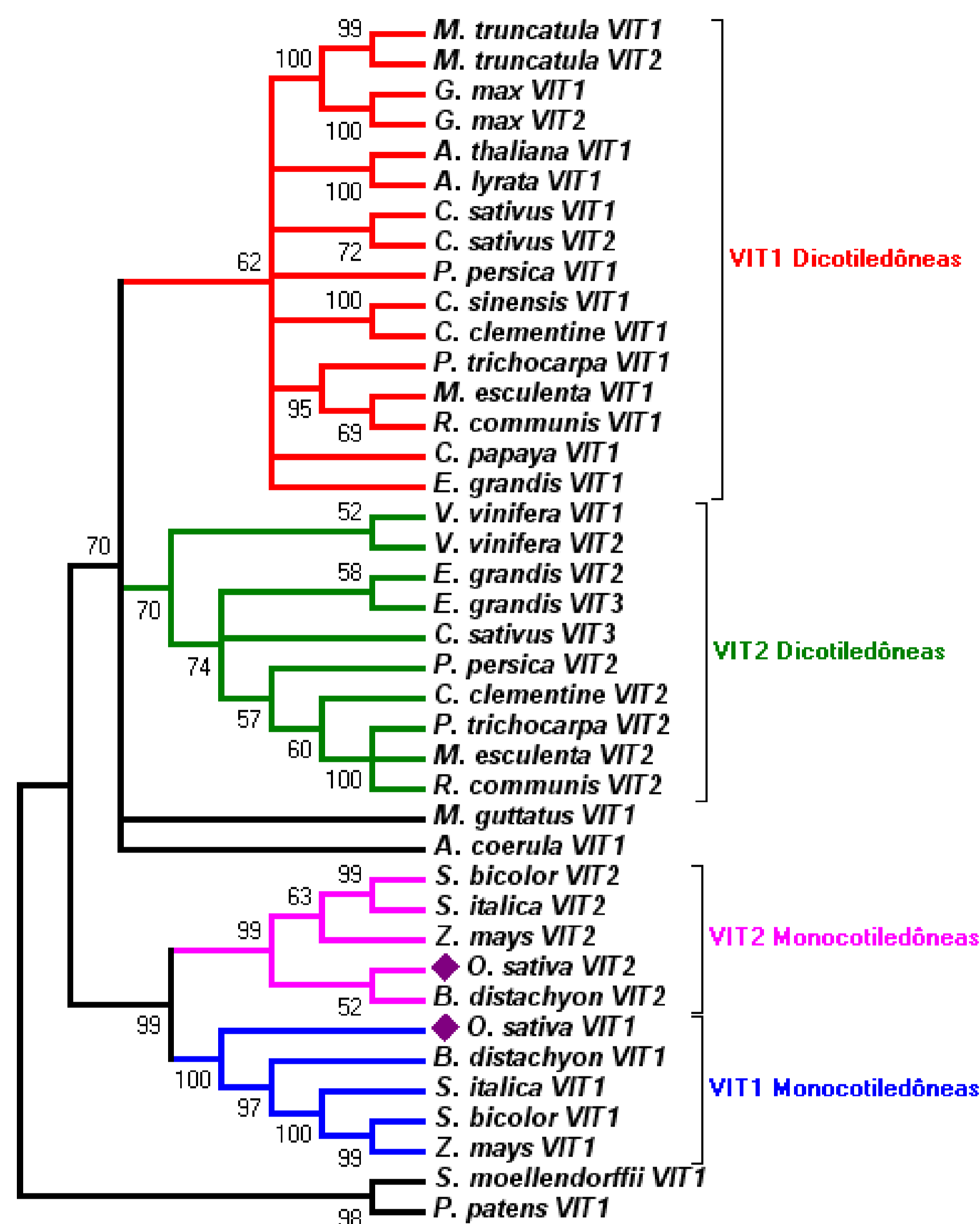


Figura 6: Árvore filogenética da família VIT obtida por método Neighbor-joining, utilizando-se de bootstrap^{7,8} para avaliar a confiabilidade dos ramos. A filogenia mostra a clara separação evolutiva da família VIT em quatro grupos: VIT1 Dicotiledôneas, VIT2 Dicotiledôneas, VIT2 Monocotiledôneas e VIT1 Monocotiledôneas. Em destaque, os homólogos de *Oryza sativa*, escolhidos para a caracterização em levedura.

Discussão

A filogenia indica a existência de um gene VIT ancestral comum a Dicotiledôneas e Monocotiledôneas e, dentro desses grupos, a duplicação em dois genes VIT homólogos, aqui nomeados como VIT1 e VIT2. Os genes *OsVIT1* e *OsVIT2* de arroz parecem ser originados de dois genes VIT já presentes em Monocotiledôneas primitivas.

A clonagem de *OsVIT1* no vetor pENTR não foi confirmada, visto que o padrão de clivagem do vetor não coincidiu com o esperado. Tendo em vista que foi realizada a amplificação completa do fragmento supostamente clivado, pode ter ocorrido um erro de amplificação no sítio de clivagem PvuI interno à sequência de *OsVIT1* ou amplificação de outro fragmento com tamanho similar ao do gene de interesse.

Perspectivas

- sequenciar o fragmento clonado no vetor pENTR;
- realizar novas clonagens de *OsVIT1* em pENTR ;
- desenvolver os trabalhos com o gene *OsVIT2*;

Referências

- Viteri, F. E. (1998) A new concept in the control of iron deficiency: communitybased preventive supplementation of at-risk groups by the weekly intake of iron supplements. *Biomed. Environ. Sci.* 11: 46-60.
- Kim, S. A. et al (2006) Localization of Iron in Arabidopsis Seed Requires the Vacuolar Membrane Transporter VIT1. *Science*. Vol 314 1295-1298.
- Momonoi K. et al (2009) A vacuolar iron transporter in tulip, TgVIT1, is responsible for blue coloration in petal cells through iron accumulation. *The Plant Journal*. Vol 59 437-447.
- Larkin, M. A. et al (2007) Clustal W and Clustal X 2.0. *Bioinformatics*. 23 (21): 2947-2948.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Bio. Evol.* 4, 406-425.
- Studien, J. A. & Keppler, K. J. (1988) A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. *Mol. Bio. Evol.* 5, 729-731.
- Efron, B. (1979) Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Annals Stat.* 7, 1-26.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence intervals on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39, 783-791.

Apoio