

DESENHO E TESTE DE PRIMERS PARA RT-PCR DE GENES QUE CODIFICAM ENZIMAS ANTIOXIDANTES DO CAFEIEIRO¹

Ana Cristina Andrade Monteiro²; Mário Lúcio Vilela de Resende³; Camila Cristina Lage de Andrade⁴; Paula Adrielly Souza Vale⁵; Sandra Elisa Guimarães⁶; Deila Magna dos Santos Botelho⁷; Rossiane Oliveira Vilela⁸; Victor Augusto Maia Vasconcelos⁹

¹ Trabalho financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT-CAFÉ), FAPEMIG, CNPq

² Pós-doutoranda em Fitopatologia – UFLA, Lavras-MG, monteiroaca@yahoo.com.br

³ Professor PhD – UFLA, Lavras-MG, mlucio@dfp.ufla.br

⁴ Doutoranda em Fitopatologia – UFLA, Lavras-MG, camilalage86@gmail.com

⁵ Mestranda em Biotecnologia Vegetal – UFLA, Lavras-MG, paula.vale15@yahoo.com.br

⁶ Doutoranda em Biotecnologia Vegetal – UFLA, Lavras-MG, sandra_ufla@yahoo.com.br

⁷ Pós-doutoranda em Fitopatologia – UFLA, Lavras-MG, deilamagna@hotmail.com

⁸ Bolsista de iniciação científica – UFLA, Lavras-MG, ro.vilela.6@gmail.com

⁹ Bolsista de iniciação científica – UFLA, Lavras-MG, victoraugusto_m@hotmail.com

RESUMO: Plantas sob estresse geralmente usam um complexo sistema de defesa antioxidante constituído de enzimas, como a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e ascorbato peroxidase. Considerando que *Coffea arabica* é uma espécie agrônoma de importância para os países produtores e que é crescente as pesquisas moleculares envolvendo o cafeeiro, o objetivo deste trabalho foi desenhar primers, para serem utilizados na técnica de RT-PCR, dos genes *SOD*, *CAT*, *GPX* e *APX* do cafeeiro, que codificam as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e ascorbato peroxidase, respectivamente. Primers foram desenhados a partir de sequências gênicas depositadas no GenBank e com o auxílio do software *Integrated DNA Technologies (IDT)*. Os primers foram confeccionados pela empresa SIGMA e, em seguida, foi realizada uma RT-PCR dos mesmos com DNA extraído de folhas de mudas de cafeeiro e com água (controle). As condições da reação foram 2 minutos a 95°C, seguidos por 30 ciclos de 40 segundos a 95°C, 35 segundos a 58°C e 20 segundos a 72°C, e finalizando com 5 minutos a 72°C. Para cada reação, foi utilizado 1,0 µL de DNA, 0,75 µL de cada primer, 5,0 µL de Green GoTaq, 2,0 µL de MgCl₂, 0,5 µL de dNTP e 0,125 µL de GoTaq, para um volume final 25,0µL por amostra. A RT-PCR foi visualizada em gel de agarose 1,5%, corado com GelRedTM. Nenhum dos primers amplificou na ausência de DNA. O primer *APX* amplificou em dois tamanhos diferentes e o primer *SOD* não ocorreu nenhuma amplificação. Somente os primers *CAT* e *GPX* amplificaram no tamanho em que foram desenhados, estando aptos para serem utilizados em trabalhos com RT-PCR.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea arabica*, Biologia molecular, enzimas de limpeza.

DESIGN AND TESTING OF PRIMERS FOR RT-PCR ANALYSIS OF GENES ENCODING ANTIOXIDANT COFFEE ENZYMES

ABSTRACT: Plants under stress often use a complex antioxidant system of defense consisting of enzymes, like as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and ascorbate peroxidase. Whereas *Coffea arabica* is a specie of agronomic importance for producing countries and that molecular research involving the coffee are growing, the aim of this work was to design primers for use in RT-PCR technique, the genes *SOD*, *CAT*, *GPX* and *APX* of coffee, which encode the enzymes superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and ascorbate peroxidase, respectively. Primers were designed from gene sequences deposited in GenBank with the aid of the Integrated DNA Technologies (IDT) software. The primers were made by company SIGMA, and then RT-PCR was performed with the same DNA extracted from leaves of coffee seedlings and water (control). The reaction conditions were 2 min 95°C, followed by 30 cycles of 40 seconds at 95°C, 35 seconds at 58°C and 20 seconds at 72°C and ending with 5 minutes 72°C. For each reaction, was used 1.0 µL of DNA, 0.75 µL of each primer, 5.0 µL of GoTaq Green, 2.0 µL of MgCl₂, 0.5 µL of dNTP, and 0.125 µL of GoTaq was used for a final volume of 25.0µL per sample. The RT-PCR was visualized on 1.5% agarose gel stained with GelRedTM. None of the primers was amplified in the absence of DNA. The *APX* primer was amplified in two fragments of different sizes and primer *SOD* showed no amplification. Only *CAT* and *GPX* primers amplified at the size that they were designed, being able to be used in works with RT-PCR.

KEYWORDS: *Coffea arabica*, Molecular biology, scavenging enzymes.

INTRODUÇÃO

O cafeeiro (*Coffea* sp.) é amplamente cultivado em países tropicais, sendo uma das culturas mais tradicionais no Brasil. As espécies de cafeeiros mais exploradas comercialmente são *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre (café conilon ou robusta), representando, respectivamente, 71,2% e 28,8% da produção nacional (MAPA, 2014). As espécies ativas de oxigênio (EAOs) ocorrem normalmente no metabolismo celular, porém, quando acumuladas, tornam-se tóxicas à célula. Plantas sob estresse, geralmente, usam um complexo sistema de defesa antioxidante constituído de antioxidantes e um diversificado leque de enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e ascorbato peroxidase (APX). Estas enzimas são utilizadas para limpar as EAOs e proteger as células de dano oxidativo (Hossain & Uddin 2011).

Diferentes técnicas possibilitam estudar estas enzimas de limpeza em diferentes culturas, bem como os genes que codificam estas enzimas. A análise da expressão gênica é de fundamental importância para o estudo das vias metabólicas e de sinalização, as quais sustentam processos celulares e de desenvolvimento. Embora vários métodos tenham sido utilizados para quantificar a expressão gênica, a PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e a PCR qualitativa (RT-PCR) são consideradas técnicas padrões pela sua sensibilidade e especificidade (Bustin et al., 2005).

Estudos com genes que codificam proteínas funcionais bem como proteínas regulatórias ou fatores de transcrição que estão envolvidos na regulação da transmissão de sinais e expressão gênica estão entre os principais alvos das pesquisas sobre a fisiologia do cafeeiro (Agarwal et al., 2006).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi desenhar primers, para serem utilizados na técnica de RT-PCR, dos genes *SOD*, *CAT*, *GPX* e *APX* do cafeeiro, que codificam as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e ascorbato peroxidase, respectivamente, para que possam ser utilizados em trabalhos futuros, inclusive com a técnica de PCR em tempo real.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa-de-vegetação e no laboratório de Fisiologia do Parasitismo do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Para formação de mudas de cafeeiro, utilizaram-se sementes de cafeeiro cv. Mundo Novo 376/4, as quais foram semeadas em bandejas contendo areia. Assim que atingiram a fase “orelha de onça”, estas foram transplantadas para sacos de polietileno de 0,50 L, contendo substrato composto por solo, areia e substrato comercial para hortaliças, na proporção 2:1:1 (v/v/v). Durante todo o período experimental, as mudas foram irrigadas periodicamente e receberam adubações complementares com formulados 20-0-20, mais micronutrientes.

Folhas de mudas de cafeeiro com dois a três pares de folhas totalmente expandidas fora coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C para posterior extração do DNA.

O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e, aproximadamente, 100 mg de cada amostra macerada foi utilizado para a extração de DNA total, a qual foi realizada utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega®), seguindo o protocolo para tecidos de plantas. A integridade do DNA foi visualizada em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed™ e as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop™ Espectrophotometer ND-100.

Primers dos genes *SOD*, *CAT*, *GPX* e *APX* do cafeeiro foram desenhados a partir de sequências gênicas depositadas no GenBank e com o auxílio do software *Integrated DNA Technologies (IDT)* (Tabela 1). Em seguida, os primers foram confeccionados pela empresa SIGMA.

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados para a análise de RT-PCR.

Genes	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho do fragmento	Nº acesso ^a
<i>SOD</i>	F: GTTGGAAGGGCAGTCGTTGTCC R: GCCTTGCAGACCAATGACACCAC	123	DQ124028
<i>CAT</i>	F: GGGAAACTATCCGGAGTG GAGACT R: GGCAGGGTTAAATGCAAGCTGC	199	DQ124023
<i>GPX</i>	F: GCGTGTCTGA AGCAATTCTCGATTCT R: GTGGCCATCGTACGATCTGACC	172	DQ123923
<i>APX</i>	F: GACTTGCAGAGCGAGCTCTCAGAAG R: AGTTTGACGGGAGAGGCTTATCTGG	97	DQ123919

^aNúmero de acesso de acordo com o GenBank; F: sequência do primer forward; R: sequência do primer reverse.

Após a aquisição dos primers, foi realizada uma RT-PCR dos mesmos com DNA extraído de folhas de mudas de cafeeiro e com água (controle). As condições da reação foram 2 minutos a 95°C, seguidos por 30 ciclos de 40 segundos a 95°C, 35 segundos a 58°C e 20 segundos a 72°C, e finalizando com 5 minutos a 72°C. Para cada reação, foi utilizado 1,0 µL de DNA, 0,75 µL de cada primer, 5,0 µL de Green GoTaq, 2,0 µL de MgCl₂, 0,5 µL de dNTP e 0,125 µL de GoTaq, para um volume final 25,0µL por amostra. A RT-PCR foi visualizada em gel de agarose 1,5%, corado com GelRedTM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar o gel de agarose da RT-PCR dos *primers* dos genes que codificam enzimas antioxidantes, observou-se que nenhum dos *primers* amplificou na ausência de DNA de folhas de cafeeiro, ou seja, nenhum primer amplificou no comprole (água). O primer *APX* amplificou em dois tamanhos diferentes e o primer *SOD* não ocorreu nenhuma amplificação. Somente os primers *CAT* e *GPX* amplificaram no tamanho em que foram desenhados, estando aptos para serem utilizados em trabalhos com RT-PCR (Figura 1)

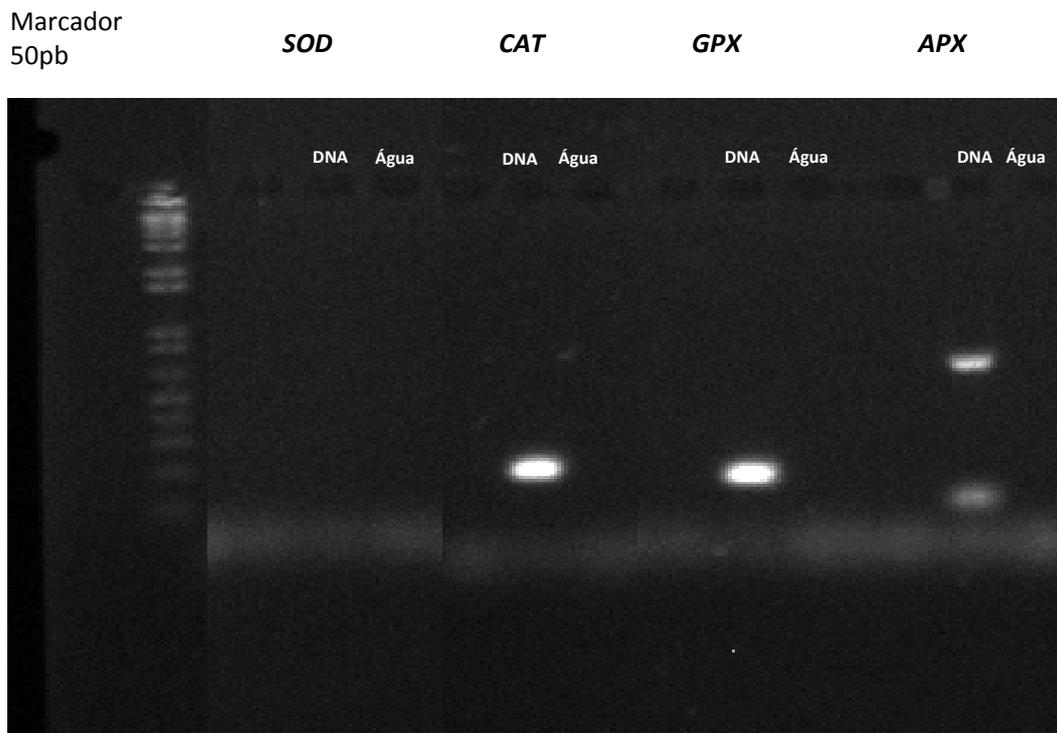


Figura 1. Gel de agarose da RT-PCR dos *primers* dos genes *SOD*, *CAT*, *GPX* e *APX* de cafeeiro, que codifica as enzimas superóxido disutase, catalase, glutationa peroxidase e ascorbato peroxidase.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de biologia molecular que permite replicação *in vitro* do DNA de forma rápida. Com a PCR, quantidades mínimas de material genético podem ser amplificadas milhões de vezes em poucas horas, permitindo a detecção rápida e fiável dos marcadores genéticos. Entretanto, para que uma PCR seja confiável, o DNA extraído e os reagentes devem estar íntegros e, principalmente, o *primer* deve ter sido desenhado corretamente, em uma região gênica confiável (Marchesi et al., 1998). Por isso o teste de *primers* é de extrema importância, para que seja verificada a confiabilidade dos *primers*,

CONCLUSÕES

Apenas os *primers* dos genes *CAT* e *GPX* estão adequados para serem utilizados em estudos de RT-PCR, sendo que podem também ser utilizados na técnica de PCR em tempo real. Já os *primers* dos genes *SOD* e *APX* não estão adequados, sendo necessário o desenho de novos *primers*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, P. K. et al. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 25, n. 12, p. 1263-1274, July 2006.

- BUSTIN, S. A. et al. Quantitative real time RT-PCR e a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, Bristol, v. 34, n. 3, p. 597-601, Jun. 2005.
- HOSSAIN, M. A. & UDDIN, S. N. Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat: Morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia. *Australian Journal of Crop Science*, v.5(9), 1094-1101, 2011.
- MAPA 2014. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. In. <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe>. Acessado em: 12 de dezembro de 2014.
- MARCHESI, J.R.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A.J.; MARTIN, T.A.; FRY, J.C.; HIOM, S.C.; WADE, W.G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *App. Environ. Microbiol.* v. 64(2):795-799, 1998.