

VALIDAÇÃO NA EFICIÊNCIA DE *PRIMERS* PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES EM *Coffea canephora* (Rubiaceae)

Gabriella Silva de Aguiar, Danilo Rodrigues Amaral, Taís Cristina Bastos
Soares.

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alto
Universitário S/N, 295000 – Alegre – ES, Brasil. gabriella.aguiar23@gmail.com,
danilorodriguesamaralipanema@hotmail.com, tcbsoares@gmail.com.

Resumo

Com as alterações climáticas, a escassez de água tornou-se um desafio mundial na agricultura. Como mecanismo de adaptação ao estresse hídrico, as plantas desencadeiam respostas a nível molecular, como modulações transcricionais e pós transcricionais. Objetivamos validar a eficiência de *primers* para RT-qPCR capazes de confirmar ou refutar as pressuposições ou hipóteses em relação à tolerância. Foram utilizados materiais genéticos de clones de *Coffea canephora* com características contrastantes de interesse para a cafeicultura, incluindo tolerância e susceptibilidade à seca. O número de ciclos no limiar de fluorescência, denominado de *cycle threshold*, foi utilizado na RT-qPCR, e calculamos a regressão dos valores de Ct em função às concentrações do cDNA para obtenção do *slope*, amplificação exponencial e eficiência. Os resultados indicaram que os valores de Ct dos genes alvo foram maiores em comparação aos genes referência, indicando que os genes alvo requerem um maior número de ciclos para a reação ocorrer. Todos os genes estudados apresentaram eficiência superior a 100%, garantindo uma boa acurácia para análises futuras de expressão relativa de genes.

Palavras-chave: Análise molecular. Expressão relativa. Regulação gênica.

Área do Conhecimento: Genética

Introdução

No contexto das alterações climáticas, a escassez de água tornou-se um desafio mundial para a agricultura (LANG *et al.*, 2018; FAHAD *et al.*, 2017). Como mecanismo de adaptação ao estresse hídrico, as plantas desencadeiam respostas nos níveis molecular, bioquímico e fisiológico. A nível molecular, a resposta à seca geralmente inclui modulações transcricionais e pós-transcricionais, que envolvem expressão diferencial de genes, mudanças metabólicas e fisiológicas associadas à aclimação da planta (ABDEL *et al.*, 2020; MASHAKI *et al.*, 2018).

A análise da expressão gênica, é uma abordagem popular e versátil com alta aplicabilidade para identificar o contexto no qual um gene é transcrito e a proteína é produzida e codificada (ABDALAH e BAUER, 2016). A quantificação precisa dos níveis de expressão pode fornecer pistas importantes para identificar e verificar as funções dos principais genes em vias celulares, auxiliando na precisão do estudo do estado fisiológico das células diante de diferentes estresses (ABDALAH e BAUER, 2016).

Entretanto, os pressupostos na execução de quantificação da expressão gênica definem parâmetros que devem ser seguidos para uma análise robusta e decisiva (LOBO e LOBO, 2014). Parâmetros como *primers* eficientes e uma ótima curva de dissociação garantem confiabilidade nos dados, conforme as normas prescritas pelo guia The MIQUE *Guidelines* (BUSTIN *et al.*, 2009) e (RADONIC *et al.*, 2004).

No gênero *Coffea* existem mais de 130 espécies descritas, entretanto, duas delas são destacadas comercialmente como base da produção mundial, sendo essas *Coffea arabica* L. (café arábica) e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner (café conilon/robusta) (DAVIS *et al.*, 2011). No Espírito Santo *Coffea canephora* (conilon) é a *commoditie* mais produzida. No entanto, durante os anos de 2015/2016, o estado sofreu com limitações significativas à capacidade produtiva das safras devido às mudanças climáticas (VENANCIO *et al.*, 2020). O estudo proposto por Davis *et al.* (2019), sugere que muitos Cafés conilon cultivados se tornarão menos adequados para o cultivo devido ao impacto das mudanças climáticas, podendo perder 60% de áreas de plantio devido a projeções de aumento da temperatura e padrões de precipitação alterados.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Considerando a relevância do conhecimento acerca do estudo genético para o entendimento dos mecanismos de tolerância à seca em *C. canephora*, objetivamos validar a eficiência de *primers* capazes de confirmar ou refutar as pressuposições ou hipóteses, visando análise diferencial de expressão desses genes no contexto de tolerância.

Metodologia

Os materiais genéticos foram obtidos a partir da seleção de progênies 109x120 e 120x109 entre clones de café conilon com características de interesse para a cafeicultura. As características são as seguintes: clone 120 - café conilon, porte médio, maturação média, suscetível à ferrugem, vigoroso e tolerante à seca; clone 109 - café conilon, porte médio, maturação média, suscetível à ferrugem e à seca.

O experimento foi conduzido em um Delineamento de Blocos Casualizados (DBC) com 10 genótipos de *C. canephora* em um espaçamento de 3x1m, com três repetições e três plantas por parcela. Folhas saudáveis e completamente expandidas foram coletadas do terceiro nó de ramos plagiotrópicos. Após a coleta, o material foi acondicionado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em ultra freezer a -80 °C.

O RNA total foi isolado utilizando o protocolo de Dos Santos *et al.* (2011), seguindo todas as recomendações técnicas para obtenção de material de boa qualidade e posteriormente tratados com DNase. A concentração do RNA foi determinada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir da enzima transcriptase reversa do GoScript® com oligo (Dt15) (Promega), seguindo orientações do fabricante.

Os *primers* testados foram sintetizados a partir das sequências codificadoras obtidas no banco de dados de café conilon (<http://coffee-genome.org/>), e desenhados a partir do software *Primer3plus*, posteriormente foram testados preliminarmente para sua especificidade.

A análise para verificar a eficiência dos *primers* foi realizada a partir da técnica de RT-qPCR (*Reverse transcription-qPCR*). A RT-qPCR foi conduzida utilizando 3 µL de cDNA em uma diluição de 3 vezes (1:3) e uma concentração final de 2 mM de cada iniciador, totalizando um volume final de 10 µL com SYBR/qPCR MasterMix, GoTaq® (Promega).

A amplificação dos *primers* (Tabela 1) começando com uma desnaturação inicial de 2 min a 94° C, seguida por 30 ciclos amplificação compostos por 94° C durante 1 min, 60° C durante 1 min e 72° C durante 1 min, o processo foi finalizado com uma extensão final de 3 minutos a 72 °C.

Tabela 1 - Sequência de *primers* analisados quanto à eficiência para análise de tolerância à seca.

Gene	Sigla	Sequência <i>Primer Forward</i>	Sequência <i>Primer Reverse</i>	ID ³ Sequência	Referência
Dehydration Responsive Element Binding ¹	DREB2A3	5'TGGCACTGCAAGG TCGATAA 3'	5'GCCAAGACAGTG GGAACCAA3'	Cc10_g1416 0	Alves, (2015)
	DREB2C	5'AGCAGCCACCAGA GAACCAA3'	5'GCACCAACAGGA TCGTGAT 3'	Cc06_g0078 0	Alves, (2015)
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase ²	GAPDH	5'TTGAAGGGCGGTG CAAA3'	5'AACATGGGTGCA TCCTTGCT3'	-	Marracini <i>et al.</i> , (2012)
Ubiquitina ²	CcUBQ10	5'AAGACAGCTTCAAC AGAGTACAGCAT3'	5'GGCAGGACCTTG GCTGACTATA3'	-	Marracini <i>et al.</i> , (2012)

¹ Genes alvos: DREB2A3 e DREB2C, ² Normalizadores: GAPDH e CcUBQ10, ³ID: acesso da sequência no *Coffea* genoma hub.

O número do ciclo no limiar de fluorescência logaritimizado, denominado de *cycle threshold* (Ct), foi obtido após a qPCR e calculado a partir das réplicas de cada gene. Foi realizada uma análise de

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

regressão dos valores de Ct em função das concentrações do cDNA para obtenção do *slope*, que representa a amplificação exponencial, esse valor foi determinado mediante a fórmula = $10^{-1/(\text{SLOPE})-1}$, proveniente da equação de eficiência (Tabela 2).

Resultados

Os valores de Ct observados foram maiores para os genes alvo quando comparados com os genes referência, o que demonstra que os genes alvo requerem um maior número de ciclos para que a reação aconteça (Tabela 2).

A partir dos valores de Ct, foram calculados os valores de eficiência da reação, mostrando que tanto os genes alvo quanto os genes referência apresentaram eficiência 100% >.

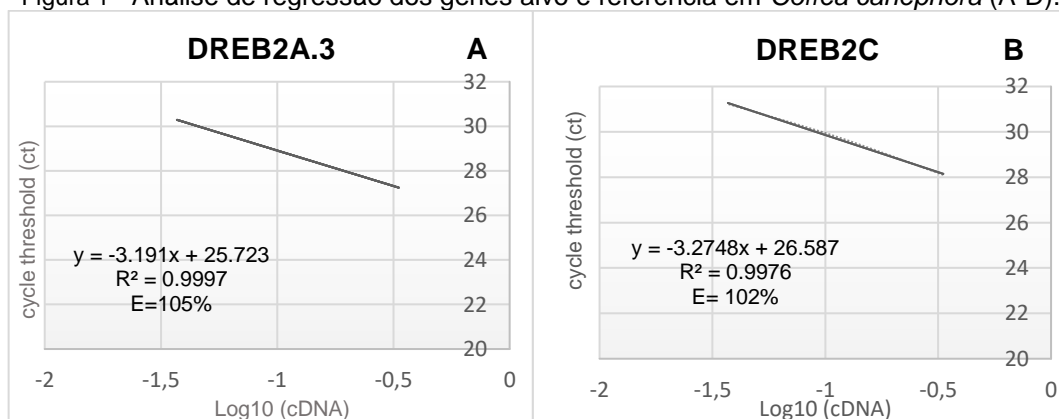
Tabela 2 - Representação dos Cts e cálculo da eficiência para os genes alvo e referência.

Gene	Primer	Ctmédio	Log ₁₀ (cDNA)	Slope ¹	Eficiência da qPCR ²
DREB2A3	2uM	27.26	-0.47	-3.191x	105%
	2uM	28.74	-0.95		
	2uM	30.30	-1.43		
DREB2C	2uM	28.10	-0.47	-3.2748x	102%
	2uM	29.80	-0.95		
	2uM	31.23	-1.43		
GAPDH	2uM	26.52	-0.47	-3.1229x	109%
	2uM	27.77	-0.95		
	2uM	29.44	-1.43		
UBQ10	2uM	22.39	-0.47	-3.212x	104%
	2uM	24.13	-0.95		
	2uM	25.45	-1.90		

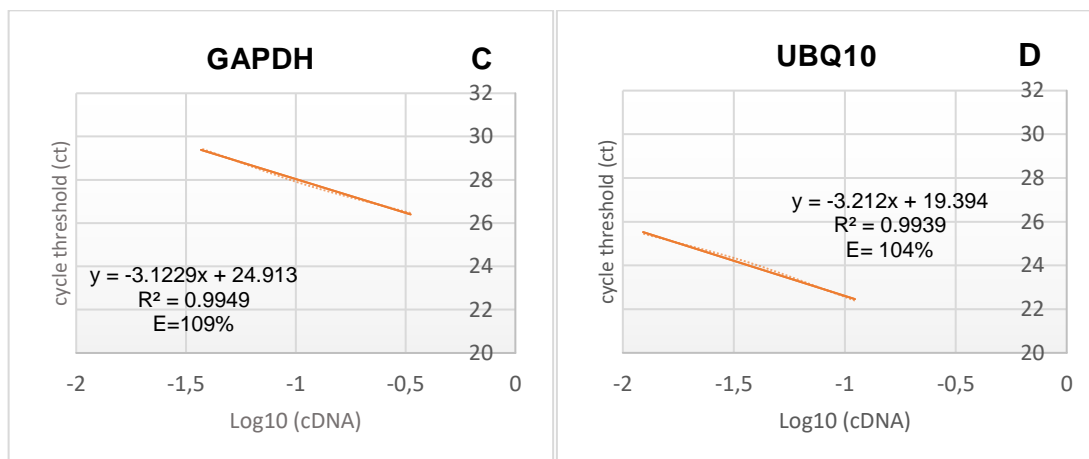
¹valor de slope calculado a partir de = $Y = ax + b$; ² fórmula da eficiência = $E = [10^{(-1/-\text{slope})-1}] \cdot 100\%$

Os valores obtidos de eficiência, calculados a partir da análise de regressão, indicaram que pelo número de ciclos realizados para cada gene a partir da diluição de (1:3), foi possível garantir uma eficiência maior que 100%, com um valor de slope próximo ou maior que -3,0 com $R^2 = 0,99$ para todos os genes testados (Figura 1 A-D).

Figura 1 - Análise de regressão dos genes alvo e referência em *Coffea canephora* (A-D).



A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições



Discussão

Uma análise de RT-qPCR com uma boa amplificação é exponencial e, em teoria, ocorre com 100% de eficiência. Grande parte dos experimentos direcionados a mRNAs ou miRNAs celulares, quantifica alterações nos níveis de RNA em várias amostras em relação aos níveis de RNA(s) de controle (BUSTIN *et al.*, 2009). Essa quantificação relativa possui a vantagem de não exigir padrões com concentrações definidas, mas depende da expressão relativamente invariante do gene de referência e de mudanças relativamente grandes no gene alvo.

Com base nos resultados obtidos, observamos que as eficiências dos genes testados, tanto para os genes alvo quanto para os genes referência, foram aproximadamente iguais. Isso corrobora com o estudo de Lobo e Lobo (2014), onde é discutido que para comparações precisas em experimentos de qPCR, é necessário que a eficiência do gene-alvo e do gene-referência seja aproximadamente igual, com eficiências em torno de 90 a 110%. Neste sentido, o valor de inclinação (*slope*) obtido deve estar entre -3,6 e -3,1 (LOBO e LOBO, 2014).

Dos genes testados, consideramos a família de genes DREB, devido aos seus fatores-chave de transcrição envolvidos em respostas a vários estresses abióticos (LATA e PRASAD, 2011). Esses genes atuam a jusante da enzima dependente do ABA e em vias de transdução de sinal independentes em respostas a estresses abióticos, resultando em uma regulação positiva de genes responsivos ao estresse e contribuindo para o aumento da tolerância (AGARWAL *et al.*, 2006).

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é um dos genes de referência mais comuns, frequentemente utilizado para normalizar os dados de expressão gênica, sendo comum no controle endógeno na análise quantitativa de RT-PCR, pois em alguns sistemas experimentais sua expressão é muito constante (WINER *et al.*, 1999; EDWARDS e DENHARDT, 1985). A ubiquitina (UBQ10), uma pequena proteína composta por 76 aminoácidos, desempenha papel fundamental em processos como degradação proteica, reparo do DNA, transdução de sinal e regulação da transcrição por endocitose (OKAZAKI *et al.*, 2000; CHAN *et al.*, 1995; CHRISTENSEN *et al.*, 1992;), sendo altamente conservada em diversos processos celulares.

No presente estudo, utilizamos esses genes como controles endógenos antes da análise de expressão relativa dos genes alvo, assegurando que todos apresentassem eficiências próximas ou iguais para garantir a maior acurácia possível dos resultados obtidos.

Para melhorar a análise dos dados, seguimos as recomendações de Yuan *et al.* (2006), que propõem a análise de regressão linear após a transformação logarítmica dos dados da concentração de cDNA. Através da equação apresentada na Tabela 2, pudemos observar uma relação linear entre o valor de Ct e a concentração linearizada, fornecendo um arcabouço robusto para a interpretação dos resultados da expressão gênica.

A análise de regressão é uma ferramenta poderosa que auxilia no entendimento das relações entre as variáveis envolvidas, proporcionando uma perspectiva mais profunda sobre a dinâmica do processo em estudo. A utilização desse método aumenta a validade dos achados deste estudo, ao mesmo tempo em que permite detectar e corrigir possíveis discrepâncias.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

É importante enfatizar que a análise de regressão linear, embora poderosa, requer uma interpretação cuidadosa dos resultados. A relação entre Ct e concentração linearizada não apenas confirma a qualidade dos dados obtidos, mas também permite inferir diferenças na expressão gênica entre as amostras.

No contexto da análise de expressão gênica, a análise de regressão fornece uma visão mais detalhada do processo de amplificação e detecção, enriquecendo a interpretação da variação observada.

Conclusão

Os genes alvo testados a partir do teste de eficiência a 1:3 de cDNA apresentaram >100% sendo favorável para comparações acuradas podendo seguir para análise de expressão relativa destes genes, em relação a tolerância à seca.

A seleção precisa e comparável de genes de referência internos para GAPDH e UBQ10, bem como quase 100% de eficiência de amplificação, estabeleceu uma base sólida para a interpretação dos resultados da expressão gênica. A seleção estratégica de genes da família DREB como alvos permitiu a análise contextual das respostas genéticas à seca, enriquecendo nossa compreensão da regulação gênica neste contexto desafiador.

Os resultados da análise de regressão demonstraram uma relação linear entre Ct e concentração de cDNA linearizado, aumentando a validade e confiabilidade dos resultados de expressão gênica. As conclusões deste estudo têm implicações potencialmente importantes para entender as respostas genéticas à seca e identificar os genes envolvidos na tolerância ao estresse abiótico, e podem ter implicações para a genética vegetal e a biotecnologia voltada para o desenvolvimento de culturas mais resilientes.

A seleção cuidadosa de genes de referência, eficiências de amplificação validadas e análise de regressão robusta apoiaram nossas conclusões. Esta pesquisa avança nossa compreensão dos mecanismos de resposta à seca, que podem ser úteis para a pesquisa e futuras aplicações

Referências

ABDALLAH HB, BAUER P. Quantitative Reverse Transcription-qPCR-Based Gene Expression Analysis in Plants. **Methods Mol Biol.** v.1363p.9-24. 2016

ABDEL-GHANY, S.E.; ULLAH, F.; BEN-HUR, A.; REDDY, A.S.N. Transcriptome analysis of drought-resistant and drought-sensitive sorghum (*Sorghum bicolor*) genotypes in response to peg-induced drought stress. *Int. J. Mol. Sci.* v,21 n, 772. 2020.

AGARWAL, P.K.; AGARWAL, P.; REDDY, M.K.; SOPORY, S.K. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**,v. 25, p.1263–1274. 2006.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CHAN, Y.L.; SUZUKI, K.; WOOL, I.G. The carboxyl extensions of two rat ubiquitin fusion proteins are ribosomal proteins S27a and L40. **Biochem Bioph Res Co.** v. 215: p.682-690. 1995

CHRISTENSEN, A.H.; SHARROK, R.A.; QUAIL, P.H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Mol Biol.** v,18: p.675-689.1992.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

DAVIS, A.P.; TOSH, J.; RUCH, N.; FAY, M.F. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, p. 357-377, 2011.

DAVIS, A.P.; CHADBURN, H.; MOAT, J.; O'SULLIVAN, R.; HARGREAVES, S.; NIC LUGHADHA, E. High extinction risk for wild *coffee* species and implications for *coffee* sector sustainability. **Sci. Adv.** v.5, 2019.

EDWARDS, D.R.; DENHARDT, D.T. A study of mitochondrial and nuclear transcription with cloned cDNA probes. Changes in the relative abundance of mitochondrial transcripts after stimulation of quiescent mouse fibroblasts. **Exp Cell Res.** v.157: p.127-143. 1985

FAHAD, S.; BAJWA, A.A.; NAZIR, U.; ANJUM, S.A.; FAROOQ, A.; ZOHAIB, A.; SADIA, S.; NASIM, W.; ADKINS, S.; SAUD, S.; et al. Crop production under drought and heat stress: **Plant responses and management options.** *Front. Plant Sci.* v.8, p.1147. 2017.

LANG, Y.; WANG, M.; XIA, J.; ZHAO, Q. Effects of soil drought stress on photosynthetic gas exchange traits and chlorophyll fluorescence in *Forsythia suspensa*. **J. For. Res.** v.29, p.45–53. 2018.

LATA, C.; PRASAD, M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. **J. Exp. Bot.** v. 62, p. 4731–4748. 2011.

LOBO, A .N. B. O.; LOBO, R. N. B. **Considerações estatísticas na análise de expressão gênica gerados pela técnica de RT- qPCR.** Documentos, Embrapa Caprinos e Ovinos, ISSN 1676-7659 ; 112.2014

MASHAKI, K.M.; GARG, V.; NASROLLAHNEZHAD GHOMI, A.A.; KUDAPA, H.; CHITIKINENI, A.; NEZHAD, K.Z.; YAMCHI, A.; SOLTANLOO, H.; VARSHNEY, R.K.; THUDI, M. RNA-Seq analysis revealed genes associated with drought stress response in kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.). **PLoS ONE**, v,13, 2018.

OKAZAKI, K.; OKAYAMA, H.; NIWA, O. The polyubiquitin gene is essential for meiosis in fission yeast. **Exp Cell Res.** v.254.p.143-152. 2000.

RADONIC, A.; THULKE, S.; MACKAY, I. M.; LANDT, O.; SIEGERT, W.; NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for a quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 313, n. 3, p. 856-862, 2004.

VENANCIO, L.P.; FILGUEIRAS, R.; MONTAVANI, E.C.; AMARAL, C.H. Impact of drought associated with high temperatures on *Coffea canephora* plantations: a case study in Espírito Santo State, Brazil. **Nature**, 2020.

YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F.; STEWART JUNIOR, C. N. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, v. 7, p. 1-12, Feb., 2006.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da FAPES e CNPQ. Agradecemos a Universidade Federal do Espírito Santo e ao Instituto Capixaba de Pesquisa e Extensão Rural (INCAPER) por toda parceria fortalecida durante o estudo.