

VALIDAÇÃO DE PRIMERS PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM *Coffea canephora*

Gabriel Permanhane da Silva¹, Leticia Rigo Tavares¹, Tais Cristina Bastos Soares¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto Universitário, s/n, Guararema – 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, permanhaneg@gmail.com, leticiarigot@hotmail.com, tcbsoares@gmail.com.

Resumo

O Brasil lidera a produção mundial de café, destacando-se com as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. As mudanças climáticas impõem desafios significativos à cafeicultura, especialmente com o aumento das temperaturas e a maior frequência de eventos climáticos extremos. Este estudo visou validar primers para a análise de expressão de genes candidatos à tolerância à seca em *C. canephora*. A metodologia envolveu a extração de RNA, síntese de cDNA e a realização de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Dez pares de primers, foram testados para especificidade e eficiência, apresentando altos níveis de precisão, com eficiência de amplificação variando entre 90% e 98%. A análise de especificidade revelou um único e bem definido pico de *melting* para todos os primers. A variação nos valores de Ct indicou diferenças significativas nos níveis de expressão entre os genes estudados. Os primers se mostraram funcionais nos materiais genéticos utilizados e nas condições experimentais aplicadas.

Palavras-chave: Café Conilon. Tolerância à seca. Especificidade de primers. Eficiência de amplificação.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

O Brasil é o principal produtor e exportador mundial de café, com uma produção em larga escala baseada principalmente em duas espécies: *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner (café conilon/robusta) (Ico, 2020). No entanto, a cafeicultura enfrenta limitações crescentes devido às mudanças climáticas, uma questão emergente no século XXI. Destacam-se o aumento das temperaturas médias globais e a ocorrência mais frequente de eventos climáticos extremos, como períodos de escassez de chuvas e ondas de calor intensas (Haworth *et al.*, 2018).

A identificação e caracterização de genes regulados diferencialmente entre genótipos de *C. canephora* tolerantes e suscetíveis à seca são fundamentais para entender os mecanismos moleculares que determinam essa característica. A expressão gênica e sua influência nos mecanismos de tolerância à seca em cultivares de café têm sido amplamente estudadas. Pesquisas focam na identificação e caracterização de genes com perfis de expressão diferencial em clones de *C. canephora* considerados tolerantes e sensíveis à seca. A maioria dos estudos utiliza primers específicos, desenvolvidos a partir de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), para ensaios de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) (Marraccini, 2021).

A PCR em tempo real (RT-qPCR) tornou-se um método poderoso e amplamente utilizado para quantificar os níveis de expressão gênica. A quantificação relativa da expressão gênica permite medir mudanças relativas na expressão sem conhecer a quantidade absoluta dos genes de referência (ou controle interno). Apesar de ser relativamente simples de implementar em um laboratório, a execução adequada da RT-qPCR é mais complexa do que muitos cientistas percebem (Schmittgen; Livak, 2008). As diretrizes MIQE (*Minimum Information For Publication Of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (Bustin *et al.*, 2009) e outros artigos metodológicos foram publicados para ajudar a melhorar a qualidade dos resultados de expressão gênica por RT-qPCR, mas a precisão e a repetibilidade dos resultados em muitas publicações permanecem não validadas (Bustin *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2021). Esse desafio está relacionado à reproduzibilidade dos dados quando as publicações não fornecem informações detalhadas sobre a qualidade das amostras, RNA, especificidade dos primers, condições otimizadas

de PCR, concentração de cDNA e eficiências de amplificação. Reações de RT-qPCR mal executadas podem levar a resultados mal interpretados, difíceis ou impossíveis de reproduzir (Zhao *et al.*, 2021).

Tendo isso em vista, este estudo teve como objetivo validar a especificidade e eficiência de primers desenvolvidos para a amplificação de nove genes candidatos à tolerância à seca em *Coffea canephora*, além de um gene de referência (*CcUBQ10*). Esses primers foram desenvolvidos por diferentes autores para identificar mecanismos moleculares associados à tolerância à seca em diferentes genótipos de *C. canephora* e utilizados em condições experimentais variadas (Lepelley *et al.*, 2007; Marraccini *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2019; Yaguinuma *et al.*, 2021). Espera-se ajustar as condições de reação para possibilitar a utilização futura destes primers com alto grau de replicabilidade dos resultados, favorecendo a comparação de resultados entre experimentos independentes.

Metodologia

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (BqMOL) do CCA/UFES. Folhas jovens e totalmente expandidas de *Coffea canephora*, clones 120 e 109, foram coletadas, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido, e armazenadas a -80°C. As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido, seguidas pela extração de RNA total utilizando o kit Purelink Plant RNA® (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 2% e sua pureza e concentração determinadas por espectrofotometria (NanoDrop 2000/2000c®, Thermo Scientific).

O RNA foi tratado para remoção de DNA contaminante com DNase I (Promega) e, em seguida, a síntese de cDNA foi realizada utilizando o sistema GoScript® Reverse Transcriptase (Promega). As reações de RT-qPCR foram realizadas em triplicata técnica e biológica, conforme as diretrizes do MIQE (Bustin *et al.*, 2009), utilizando 3 µL de cDNA diluído (1:5, 1:25, 1:125, 1:625) e 0,5 µM de cada primer (Tabela 1) em um volume final de 10 µL com SYBR/qPCR MasterMix (Promega). A amplificação foi conduzida em termociclador Roche LightCycler® 96 com 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1 min. Os valores de *Threshold Cycle* (Ct) foram analisados com o software LightCycler® 96 SW 1.1.

Tabela 1 - Sequências de primers utilizados nas reações de RT-qPCR.

Gene	ID	Sequência (5'-3')		Autor
<i>CcUBQ10</i>	GW488515 ⁽¹⁾	F:	AAGACAGCTAACAGAGTACAGCAT	Marraccini <i>et al.</i> (2012)
		R:	GGCAGGACCTGGCTGACTATA	
<i>CcWRKY2</i>	GT647873 ⁽¹⁾	F:	CATGATCCCAAAGCAGTTATTACG	Marraccini <i>et al.</i> (2012)
		R:	TTCTGGCAGTTGGTACATCATGAT	
<i>CcPP2C</i>	GW435032 ⁽¹⁾	F:	CGAAGAAATCAGGCGTATCAGAG	Marraccini <i>et al.</i> (2012)
		R:	TAAACCGCACGTCACCAAAG	
<i>CcEDR2</i>	DV681462 ⁽¹⁾	F:	CGGCATAAGAGCGAGTGGAA	Marraccini <i>et al.</i> (2012)
		R:	ATGCAATCGCTGGTAGAAAAA	
<i>CCoAOMT1</i>	EF153933 ⁽¹⁾	F:	TGCGGAAAGTTGGGAATCA	Lepelley <i>et al.</i> (2007)
		R:	AAGAGGAGGAAGCAAAAGAAGTAGGT	
<i>CcRAP2.4</i>	DV696821 ⁽¹⁾	F:	AGGGCTCACTTGGGCTCAAT	Torres <i>et al.</i> (2019)
		R:	TCGTTCTGGAGGCTGAATCG	
<i>CcTIP1;2</i>	Cc01_g10300 ⁽²⁾	F:	GGCGCATGGTGTATCTGTGT	Yaguinuma <i>et al.</i> (2021)
		R:	GGCTGTGGCATAGACGGGTGA	
<i>CcTIP2;1</i>	Cc04_g02840 ⁽²⁾	F:	GCCATGGCCTACAGCAAAT	Yaguinuma <i>et al.</i> (2021)
		R:	GAGAAAACCATGGCAAATG	
<i>CcPIP2;3</i>	Cc06_g03900 ⁽²⁾	F:	TTCATGCCACCCCTCTGTT	Yaguinuma <i>et al.</i> (2021)
		R:	TTGGCCTTGGTGTAGATTG	
<i>CcPIP2;4</i>	Cc09_g02170 ⁽²⁾	F:	CATGGTGGCTCAGTGTAGGT	Yaguinuma <i>et al.</i> (2021)
		R:	TCCTCCGCCGTATGTGACAT	

⁽¹⁾ Gene Bank, ⁽²⁾ *Coffea canephora* Genome Hub

Fonte: o autor.

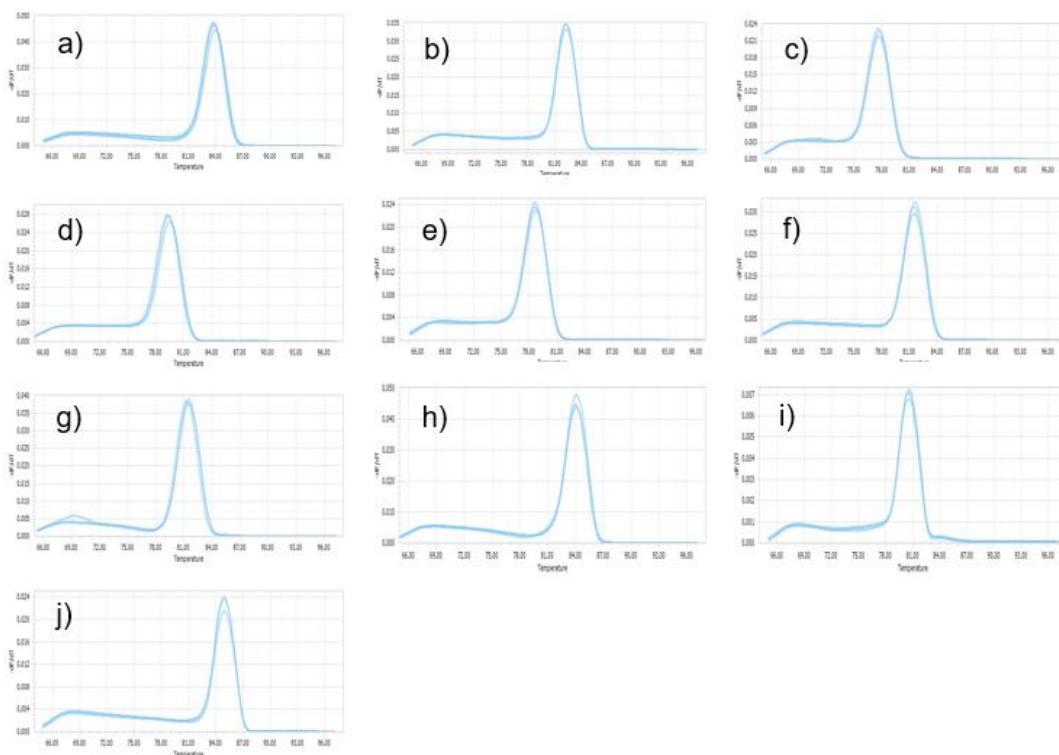
A especificidade dos primers foi confirmada pelos picos de *melting* em triplicatas utilizando um *pool* de cDNA, sendo considerados específicos aqueles com pico único. A eficiência das reações foi

determinada pela fórmula $E = 10^{(-1/Slope)}$, com testes em diluições seriadas de cDNA (1:5, 1:25, 1:125, 1:625). O valor de *slope* corresponde à inclinação da curva de amplificação. Primers com eficiência entre 90% e 110% e $R^2 \geq 0,99$ foram considerados adequados.

Resultados

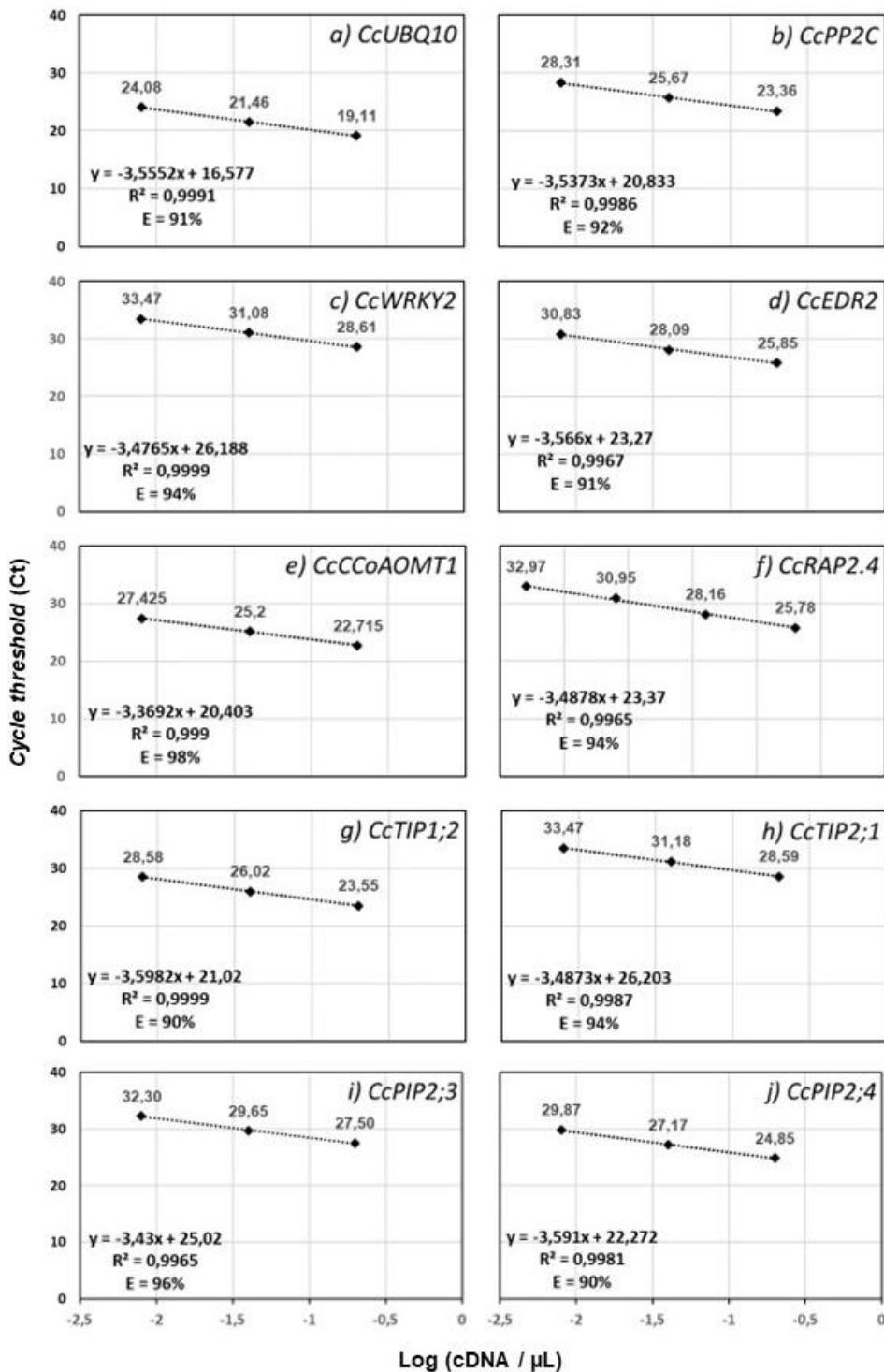
Em relação à especificidade, os dez pares de primers testados se mostraram altamente específicos, produzindo apenas um pico de *melting* (Figura 1). Todas as reações de amplificação foram consideradas bem sucedidas, produzindo valores de Ct entre 19,11 (*CcUBQ10*) e 28,61 (*CcWRKY2*) no ponto de diluição de cDNA mais concentrado (1:5), e variando entre 24,08 (*CcUBQ10*) e 33,47 (*CcWRKY2* e *CcTIP2;1*) no ponto de diluição menos concentrado (1:125), estando, portanto, dentro do limite de detecção confiável pelo aparelho. Em relação a eficiência (E), os dez pares de primers testadas foram considerados satisfatórios neste experimento, variando de 90% a 98% (Figura 2).

Figura 1 - Picos de *melting* produzidos pelos produtos das reações de RT-qPCR, pelos pares de primers correspondentes aos genes a) *CcUBQ10*, b) *CcWRKY2*, c) *CcPP2C*, d) *CcEDR2*, e) *CcCCoAOMT1*, f) *CcRAP2.4*; g) *CcTIP2;2*, h) *CcTIP2;1*, i) *CcPIP2;3*, j) *CcPIP2;4*.



Fonte: o autor.

Figura 2 - Regressão linear dos valores de Ct (Cycle Threshold) em função da Concentração de cDNA e valores de Eficiência da Reação (E).



Fonte: o autor.

Discussão

A precisão da análise de RT-qPCR depende fortemente de três fatores principais: (i) a especificidade dos primers, (ii) a otimização das condições de amplificação, e (iii) a acurácia na normalização dos

transcritos utilizando genes de referência expressos de forma estável (Bustin *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2021).

Genes homólogos altamente similares (ou idênticos) frequentemente existem em um genoma de interesse devido a duplicações do genoma e de genes. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são os únicos nucleotídeos que podem discernir as diferenças entre essas sequências de genes homólogos e podem ser usados para projetar primers robustos e específicos para cada sequência gênica. Desta forma, a DNA polimerase SYBR Taq é capaz de diferenciar os SNPs nas últimas uma ou duas posições nucleotídicas na extremidade 3' de cada primer, entre quaisquer duas sequências homólogas. No entanto, isso só pode ser alcançado sob condições de RT-qPCR otimizadas (Zhao *et al.*, 2021). O pico da curva de *melting* fornece indícios sobre a integridade e o comprimento do produto da amplificação. Um único pico indica a fusão dos produtos de PCR a uma temperatura específica, o que sugere que há apenas um produto de PCR presente (Abdallah; Bauer, 2016). Neste estudo, os dez pares de primers testados demonstraram alta especificidade, como evidenciado pela produção de um único e bem definido pico de *melting* (Figura 1).

A eficiência de uma reação de PCR é definida como a fração das moléculas-alvo que são copiadas em um ciclo de replicação (Lalam, 2006). Uma eficiência hipotética de 100% indica uma duplicação completa dos fragmentos de PCR em cada ciclo (Abdallah; Bauer, 2016). As eficiências de amplificação dos primers variaram entre 90% e 98%, valores que são considerados adequados para ensaios de RT-qPCR. Embora dois pares de primers (*CcTIP1;2* e *CcPIP2;4*) tenham apresentado eficiências no limite mínimo aceitável (90%), esses valores ainda se mantêm dentro da faixa recomendada, de 90 a 110% (Roche, 2003). A técnica $2^{-\Delta Ct}$, amplamente utilizada por sua rapidez e eficiência, requer que a eficiência de amplificação seja equivalente, tanto para os genes de referência quanto para os genes-alvo, o que foi atendido pelos resultados obtidos (Lobo; Lobo, 2014).

A amplitude de detecção foi outro aspecto relevante avaliado, com nove dos dez genes testados apresentando uma função linear utilizando três pontos de diluição, o que é suficiente para produzir uma curva padrão confiável. O gene *CcRAP2.4* se destacou ao manter sua eficiência até quatro pontos de diluição, demonstrando uma maior robustez na detecção de uma ampla gama de níveis de transcrição. Os valores de Ct obtidos indicam diferenças significativas nos níveis de transcrição entre os genes analisados. O gene *CcUBQ10* foi o mais transcrito, com o menor valor de Ct (19,11) no primeiro ponto de diluição, sugerindo uma alta abundância nas amostras. Em contrapartida, o fator de transcrição *CcWRKY2* foi o menos transcrito, exibindo o maior valor de Ct (28,61) na diluição 1:5. Essa variação é crucial para estudos que buscam identificar genes diferencialmente expressos. A faixa de Ct observada é adequada para análises de expressão relativa (Bustin *et al.*, 2009).

Conclusão

A validação dos primers para RT-qPCR em *C. canephora* revelou alta especificidade e eficiência, confirmado sua utilidade para estudos de expressão gênica relacionados à tolerância à seca nos genótipos 120 e 109, nas condições experimentais testadas. A robustez dos primers e a precisão dos resultados obtidos permitem comparações confiáveis em experimentos futuros, contribuindo para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na tolerância à seca em café.

Referências

ABDALLAH, H. B.; BAUER, P. Quantitative reverse transcription-qPCR-based gene expression analysis in plants. *Plant Signal Transduction: Methods and Protocols*, p. 9-24, 2016.

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.; WITTWER, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. v. 55, p. 611–622, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>. Acesso: 20 ago. 2024.

HAWORTH, M.; MARINO, G.; BRUNETTI, C.; KILLI, D.; DE CARLO, A.; CENTRITTO, M. The Impact of Heat Stress and Water Deficit on the Photosynthetic and Stomatal Physiology of Olive (*Olea*

europaea L.) - A Case Study of the 2017 Heat Wave. **Plants**, v. 7, n. 4, p. 76, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/plants7040076>. Acesso em: 20 ago. 2024.

ICO-International Coffee Organization (2020). **Global coffee trade**. Disponível em: http://www.ico.org/tradestatist_ics.asp. Acesso em: 20 ago. 2024.

LALAM, N. Estimation of the reaction efficiency in polymerase chain reaction. **Journal of theoretical biology**, v. 242, n. 4, p. 947-953, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2006.06.001>. Acesso em: 20 ago. 2024.

LEPELLEY, M.; CHEMINADE, G.; TREMILLON, N.; SIMKIN, A.; CAILLET, V.; MCCARTHY, J. Chlorogenic acid synthesis in coffee: An analysis of CGA content and real time RT-PCR expression of *HCT*, *HQT*, *C3H1*, and *CCoAOMT1* genes during grain development in *C. canephora*. **Plant Science**, v. 172, n. 5, p. 978-996, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.02.004>. Acesso em: 20 ago. 2024.

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.

MARRACCINI, P. Gene expression in coffee. **Progress in Botany** Vol. 82, p. 43-111, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/124_2020_42. Acesso em: 20 ago. 2024.

MARRACCINI, P.; VIEIRA, L. G. E.; VINECKY, F.; ELBELT, S.; VIEIRA, N. G.; CARNEIRO, F. A.; SILVA, V. A.; ALEKCEVETCH, J. C.; POT, D.; DA SILVA, F. R.; DAMATTA, F. M.; RAMOS, H. J. O.; SUJII, P. S.; ALVES, G. S. C.; FERRÃO, M. A. G.; LEROY, T.; ANDRADE, A. C. Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 4191-4212, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/ers103>. Acesso em: 20 ago. 2024.

ROCHE, A. S. Overview of LightCycler Quantification Methods. **Technical Note LC**, v. 10, 2003. Disponível em: https://biochimie.umontreal.ca/wp-content/uploads/sites/37/2015/11/overview_quant_met.pdf. Acesso em: 20 ago. 2024.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>. Acesso em: 20 ago. 2024.

TORRES, L. F.; REICHEL, T.; DÉCHAMP, E.; DE AQUINO, S. O.; DUARTE, K. E.; ALVES, G. S. C.; SILVA, A. T.; COTTA, M. G.; COSTA, T. S.; DINIZ, L. E. C.; BREITLER, J. C.; COLLIN, M.; PAIVA, L. V.; ANDRADE, A. C.; ETIENNE, H.; MARRACCINI, P. Expression of DREB-like genes in *Coffea canephora* and *C. arabica* subjected to various types of abiotic stress. **Tropical Plant Biology**, v. 12, p. 98-116, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12042-019-09223-5>. Acesso em: 20 ago. 2024.

YAGUINUMA, D. H.; DOS SANTOS, T. B.; DE SOUZA, S. G. H.; VIEIRA, L. G. E.; RIBAS, A. F. Genome-wide identification, evolution, and expression profile of aquaporin genes in *Coffea canephora* in response to water deficit. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 39, n. 1, p. 146-162, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11105-020-01235-w>. Acesso em: 20 ago. 2024.

ZHAO, F.; MAREN, N. A., KOSENTKA, P. Z., LIAO, Y. Y., LU, H., DUDUIT, J. R., LIU, W. An optimized protocol for stepwise optimization of real-time RT-PCR analysis. **Horticulture Research**, v. 8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038%2Fs41438-021-00616-w>. Acesso em: 20 ago. 2024.

Agradecimentos

À CAPES, à FAPES e ao CNPq, pelo custeamento do projeto de pesquisa e fornecimento de bolsas.