

SELEÇÃO DE *PRIMERS* PARA O GENE DA ACTINA PARA ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO EM VARIANTES MORFOLÓGICOS DE CACTOS DO GÊNERO *CEREUS*.

Everaldo dos Santos (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Sanny Damazio Domingues (Co-autor), Maria de Fátima Pires da Silva Machado (Orientador), e-mail: mfpismachado@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área: 20200005 - Genética. Subárea: 20203004 - Genética Vegetal

Palavras-chave: cactos, epigenética, variação fenotípica

Resumo:

Plantas do gênero *Cereus* apresentam diferentes morfologias de caules cujos fatores determinantes das morfologias variadas ainda estão por ser determinados. Por isto, a proposta do presente estudo foi padronizar as condições da amplificação do gene de Actina que é um gene relacionado à morfologia das células e tecidos, para utilizá-lo na análise do padrão de metilação em sequências de nucleotídeos específicas das variantes fenotípicas do gênero *Cereus* (ereto, *tortuosus* e *monstruosus*). As sequências específicas de DNA codificadoras de proteínas (genes) associadas com a morfologia das células tais como actina, devem ser marcadas com bissulfato de sódio que converte a citosina não-metilada em uracila, enquanto a 5-metilcitosina permanece inalterada. A comparação das sequências após a aplicação da técnica é realizada no *software* BLAST para avaliar o padrão de metilação dos referidos genes no genoma de *Cereus*.

Introdução

Com aproximadamente 128 gêneros e 1450 espécies, a família Cactaceae apresenta plantas do gênero *Cereus* que têm potencial econômico, industrial, forrageiro e ornamental (ROCHA, 2002). Dentre os cactos do gênero *Cereus* que são utilizados como plantas ornamentais, são encontradas variantes morfológicas que apresentam caules eretos, *tortuosus* e *monstruosus*. Os caules eretos têm as costelas contendo os meristemas axilares eretas; nos caules *tortuosus* as costelas estão dispostas em espiral e nos caules *monstruosus* as costelas formam sulcos irregulares (HUNT, 2006). Em estudos prévios utilizando marcadores moleculares não foram encontrados marcadores associados às diferentes morfologias. Por isso, a hipótese no presente estudo é que modificações epigenéticas relacionadas à regulação da expressão gênica (TANG, 2007) podem ser os fatores

determinantes para o surgimento da heterogeneidade fenotípica encontrada nas variedades morfológicas. A primeira etapa para investigar a ocorrência de alterações epigenéticas é a seleção e amplificação de prováveis genes relacionados com a morfologia das células, para a posterior análise do padrão de metilação dos referidos genes.

O objetivo no presente estudo foi selecionar e estabelecer as condições adequadas para a amplificação do gene da actina, uma das proteínas citoplasmáticas relacionada com a estrutura e dinâmica celular.

Materiais e métodos

1. **Extração de DNA Genômico:** O DNA foi extraído de caules frescos (40-80 mg) de plantas de *Cereus* (três plantas de cada morfologia: caules ereto, *tortuosus* e *monstruosus*), que estão sendo cultivadas no banco de germoplasma do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (DBC/UEM). As amostras foram preparadas individualmente de acordo com o protocolo descrito por Aljanabi et al. (1999).
2. **Quantificação do DNA:** A quantificação do DNA extraído foi realizada por espectrofotometria no NanoDrop™ Thermo Scientific™ Lite Spectrophotometer.
3. **Síntese dos primers:** Foram sintetizados dois *primers* para o gene da actina, por se tratar de uma proteína relacionada à morfologia e metabolismo das plantas. Devido ao gênero *Cereus* não possuir o genoma sequenciado, para o desenho de *primers* específicos foram utilizadas sequências do gene de actina de *Arabidopsis thaliana* e sequências do gene actina da família Cactaceae, dos gêneros *Hylocereus*, *Ferocactus* e *Opuntia* disponíveis no Banco de Dados GenBank. Para a síntese dos *primers* foi utilizado o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) que possibilita o alinhamento e sobreposição das sequências de actina de *A. thaliana* com as sequências de Cactaceae. A região delimitada para desenhar os *primers* foi de 891-1289 pb para a sequência *Forward* (F) e 1740-2336 pb para a sequência *Reverse* (R). Após a análise das sequências, considerando a maior porcentagem de sobreposição homóloga de nucleotídeos, foram escolhidos os pares 3 (F e R) e 9 (F e R) como sequências de referência para a síntese dos *primers* (Tabela 1).
4. **Amplificação do DNA com os primers:** Em princípio foram seguidas as condições de PCR baseadas em Domingues (2017). Posteriormente, foram realizados testes com diferentes temperaturas de anelamento (40°C a 52°C) em concentrações de MgCl₂ de 4,0 mM. O produto de cada amplificação foi submetido à eletroforese feita em gel de agarose 1,7%, com 60 V durante 4 horas. Para estimar o tamanho das sequências amplificadas foi utilizado o marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). A coloração do gel foi feita usando uma solução de brometo de etídio 0,5 mg/mL, e a imagem foi capturada em um transiluminador L-PIX HE, Loccus Biotecnologia.

5. *Análise dos dados*: As sequências dos *primers* disponíveis no programa BLAST foram usadas para estimar por comparação o tamanho dos fragmentos amplificados, observado nos caules das plantas de *Cereus* (Tabela 1).

Tabela 1. Tamanho e sequências dos *primers* de actina desenhados pelo BLAST.

Primer	Região e tamanho do fragmento em pb	Sequência Forward	Sequência Reverse
Actina par 3	1162-1846=684	TCCTCTTAACCCGAAA GCCG	GGTGACGGCCTGCTAA ATCT
Actina par 9	1173-1854=681	CGAAAGCCGATCGTG AGAAG	GTTGGTTAGGTGACGG CCTG

Resultados e Discussão

A metodologia utilizada para a extração do DNA foi considerada como eficiente, porque foi possível obter uma solução de DNA livre de polissacarídeos. As concentrações das amostras de DNA variaram de 15 a 150 ng/μL. As temperaturas que proporcionaram géis com bandas mais nítidas foram de 40°C e 43°C. O *primer* par 3 para a actina apresentou maior nitidez de banda do que o par 9. Contudo na análise do bandejamento no gel foi possível observar que os *primers* utilizados amplificaram outras sequências do DNA, além da sequência do gene para a actina (Figura 1). Devido ao gênero *Cereus* não possuir o genoma sequenciado, o desenho de *primers* para a sequência do gene da actina deverá ser refeito utilizando sequências de DNA de outras espécies. Como a região gênica ainda não foi isolada, os testes de análise de metilação utilizando bissulfito de sódio serão realizados em próximos estudos. Apesar de a metodologia utilizada não proporcionar a amplificação específica do gene de actina no DNA das plantas do gênero *Cereus*, as informações obtidas são cientificamente relevantes por se tratar de um estudo pioneiro envolvendo a epigenética, que é um campo relativamente novo com muito potencial para ser explorado.

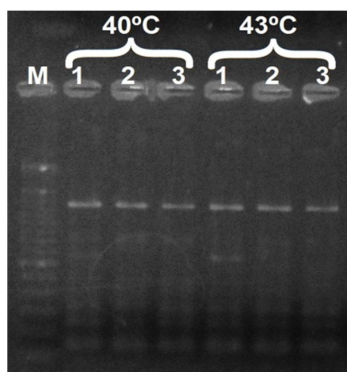


Figura 1 – Gel de agarose resultado da amplificação com o *primer* par 3 para a actina. DNAs utilizados: caules ereto (1), *tortuosus* (2) e *monstruosus* (3). Marcador molecular 1Kb (M).

Conclusões

Os *primers* das sequências do gene da actina em *A. thaliana* e nos gêneros *Hylocereus*, *Ferocactus* e *Opuntia* amplificaram mais de uma sequência de DNA de plantas de *Cereus*. A seleção de *primers* heterólogos (de outras espécies) a partir do BLAST é uma estratégia laboriosa que parece requerer mais investimentos (utilizar sequências de *primers* de outras espécies disponíveis no programa BLAST e/ou tamanho dos fragmentos de pares de bases diferentes) no processo de seleção dos *primers* para amplificar somente o gene para a actina.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná - Fundação Araucária (Processo 4168/ 2019) pelo suporte financeiro para a realização deste estudo.

Referências

ALJANABI, S. M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide- and polyphenol-freesugarcane DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 1-8, 1999.

DOMINGUES, S. D.; NEVES, A. F.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S. Seleção de *primers* para análise de *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) em *Cereus* sp. (Cactaceae). **Revista Biotecnologia & Ciência**, v. 6, n. 2, p. 46-54, 2017.

HUNT, D.; TAYLOR, N.P.E.; CHARLES, G. **The New Cactus Lexicon**. UK: DH books, 2006.

ROCHA, E. A.; AGRA, M. F. Flora do Pico do Jabre, Paraíba, Brasil: Cactaceae Juss. **Acta Botânica Brasilica**, v. 16, n. 1, p. 15-21, 2002.

TANG, W.; HO, S. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 8, n. 2, p. 173-82, 2007.