

## UTILIZAÇÃO DE INICIADORES A PARTIR DO GENE INIBIDOR DE $\alpha$ -AMILASE PARA VERIFICAÇÃO DE HOMOLOGIA EM FEIJÃO-CAUPI

S. V. P. A. MACIEL<sup>1</sup>, P. S. C. LIMA<sup>2</sup>, P. H. S. SILVA<sup>3</sup>, A. C. A. LOPES<sup>4</sup>

**Resumo** - O feijão-caupi apresenta extensa área cultivada na região Nordeste do Brasil, porém sofre grande infestação do caruncho (*Callosobruchus maculatus*), principalmente durante o armazenamento. O uso de cultivares que possuam algum tipo de resistência genética ao inseto constitui um método de controle promissor para essa região. Neste trabalho, foi delineado, com auxílio do programa computacional Gene Runner, um par de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação por PCR do gene inibidor de alfa-amilase do feijão comum. A reação de amplificação foi otimizada até a obtenção de uma banda com perfil eletroforético desejável. Esses iniciadores mostraram boa reprodutibilidade de amplificação, sendo considerados ideais para análise de polimorfismo. E, assim, utilizá-los como marcadores da presença de inibidores da enzima alfa-amilase em germoplasma de feijão-caupi.

**Palavras-chave:** desenho de iniciadores, polimorfismo, feijão-caupi.

## USE OF PRIMERS FROM GENE $\alpha$ -AI1 FOR VERIFICATION OF HOMOLOGY IN COWPEA

**Abstract** – The cowpea is of planted area in Northeastern Brazil, but has large infestation of the weevil (*Callosobruchus maculatus*), particularly during storage. The use of cultivars that have some type of genetic resistance to insects is a promising method of control in that region. This work was outlined, using the computer program Gene Runner, a pair of oligonucleotide primers for PCR amplification of the gene for alpha-amylase inhibitor of common bean. The amplification reaction was optimized to obtain a band with electrophoretic profile desirable. These primers showed good frequency and efficiency of amplification and is considered ideal for analysis of polymorphism. Therefore, use them as markers of the presence of inhibitors of the enzyme alpha-amylase in germplasm of cowpea.

**Keywords:** design of primers, polymorphism, cowpea.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Teresina-PI. E-mail: [svanessamaciel@hotmail.com](mailto:svanessamaciel@hotmail.com)

<sup>2</sup> Embrapa Meio-Norte, Caixa Postal 01, CEP 64006-220, Teresina, PI. E-mail: [sarmanho@cpamn.embrapa.br](mailto:sarmanho@cpamn.embrapa.br)

<sup>3</sup> Embrapa Meio-Norte, Caixa Postal 01, CEP 64006-220, Teresina, PI. E-mail: [phsilva@cpamn.embrapa.br](mailto:phsilva@cpamn.embrapa.br)

<sup>4</sup> Universidade Federal do Piauí, Departamento de Biologia, Teresina-PI. E-mail: [acalopes@yahoo.com.br](mailto:acalopes@yahoo.com.br)

## Introdução

O caruncho (*Callosobruchus maculatus*) é uma das principais pragas dos grãos do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), importante fonte de proteína em regiões tropicais e subtropicais. A infestação pelo caruncho começa no campo e continua na armazenagem, podendo danificar totalmente os grãos após cinco meses (MBATA, 1993).

Nos países produtores de feijão-caupi, a seleção de cultivares resistentes constitui uma alternativa promissora para a redução das perdas provocadas pelas pragas de grãos no armazenamento.

O melhoramento genético e as técnicas de biologia molecular possibilitam a incorporação de tais fatores de resistência às novas cultivares. Grande parte das pesquisas nesta área tem sido direcionada ao uso de inibidores da  $\alpha$ -amilase, uma vez que essas substâncias impedem a digestão do amido no trato digestivo dos carunchos e estes são altamente dependentes do amido para seu suprimento de energia (COUTINHO et al., 2003).

No genoma do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) está presente uma seqüência de 735 pares de bases denominada  $\alpha$ -AI1 que expressa uma proteína com atividade contra as alfa-amilases do caruncho (*Callosobruchus maculatus*).

Este trabalho teve como objetivo, o delineamento de um par de oligonucleotídeos iniciadores a partir do gene inibidor de alfa-amilase do feijão-comum  $\alpha$ AI-1 para utilizá-los como marcadores da presença de inibidores de alfa-amilase em bancos de germoplasma de feijão-caupi.

## Material e Métodos

O experimento foi executado no Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte (Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte), localizada em Teresina – PI.

### Busca e seleção da EST

A pesquisa da seqüência do gene  $\alpha$ AI-1 foi realizada no banco de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>) do NCBI no acesso AY603476 e está presente no locus de mesmo número. Possui 735 pares de bases, foi seqüenciada a partir do genoma de *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto e codifica uma proteína com 244 aminoácidos.

Com base nesta seqüência, foi realizado o desenho de um par de oligonucleotídeos iniciadores com auxílio do programa computacional Gene Runner.

### Desenho dos iniciadores

Para a escolha dos iniciadores com as propriedades mais adequadas foi empregado o programa Gene Runner. A seqüência nucleotídica foi inserida na janela de análise de oligonucleotídeos iniciadores do programa. Em seguida, na caixa de diálogo para desenho de iniciadores, alteraram-se algumas variáveis até que apresentassem os seguintes parâmetros: 50 – 55% G-C, temperatura média de fusão (Tm) por volta de 55°C, com diferença máxima de 1°C entre o par de iniciadores e 20 nucleotídeos de extensão para os iniciadores e entre 600 e 700 para o produto da amplificação.

Após essa análise, o programa gerou uma lista com 12 combinações de oligonucleotídeos iniciadores contendo informações sobre cada uma das combinações. Com base nestas informações (tamanho, concentração GC e Tm dos produtos, bem como dos iniciadores) foi selecionado um par de iniciadores para amplificação do gene  $\alpha$ AI-1. Os iniciadores escolhidos foram sintetizados pela Invitrogen.

### **Reação e otimização da reação de amplificação da EST $\alpha$ AI-1**

A extração do DNA se deu através do método CTAB 2% conforme descrito por Doyle e Doyle (1991). As amplificações por PCR foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 5' TCT CAC CCT CGC AAA CTC AG 3' e 5' TTG AGG ACG ATG TTG GAA CG 3'.

Inicialmente, a reação foi realizada em volume final de 20,0  $\mu$ L, contendo 0,3  $\mu$ L do DNA extraído; 2,0  $\mu$ L de tampão para PCR (Gibco BRL); 0,5  $\mu$ L de dNTPs; 0,6  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>; 16,0  $\mu$ L de dH<sub>2</sub>O; 0,2  $\mu$ L de cada iniciador; e 0,2  $\mu$ L de Taq Polimerase (Gibco BRL). Utilizou-se um programa inicial de 1 minuto a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e um ciclo final de 5 minutos a 72°C.

Na tentativa de otimizar o padrão da banda amplificada, foram feitos dez testes alterando o volume de alguns reagentes, a temperatura de anelamento e o número de ciclos. Todos os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%), a 80 volts por cerca de 120 minutos.

## **Resultados e Discussão**

### **Definição dos iniciadores**

Após a análise do Gene Runner, foram obtidas 12 combinações de iniciadores, dos quais apenas um par foi escolhido. A escolha do iniciador senso 5' – 3' TCT CAC CCT CGC AAA CTC AG, denominado  $\alpha$ S e do anti senso 5' – 3' TTG AGG ACG ATG TTG GAA CG, denominado  $\alpha$ A foi baseada nas principais características que devem ser observadas para o desenho de iniciadores com boa frequência e eficiência de amplificação.

Segundo Newton e Gaham (1994), em geral, uma aproximação igual do número de cada uma das quatro bases é recomendada para iniciadores de PCR. Dos iniciadores escolhidos, o senso  $\alpha$ S apresenta 55% de GC e o anti-senso 50%, observando que o produto apresenta 50,4% de GC, estes estão de acordo com os valores citados na literatura.

Cada um dos iniciadores selecionados contém 20 bases, pois segundo Dieffenbach et al. (1993), oligonucleotídeos contendo entre 18 e 24 bases tendem a ser mais específicos, uma vez que a especificidade da reação é geralmente controlada pelo tamanho do iniciador e temperatura de anelamento da PCR. Outra característica que deve ser observada é a Tm do par de iniciadores que, segundo Innis e Gelfand (1990), deve ser balanceada.

Do par de iniciadores selecionado, o senso apresenta Tm de 52,7°C e o anti-senso de 53,3°C, com diferença de 0,6°C. Essas temperaturas foram estimadas pelo próprio programa seguindo a fórmula "nearest-neighbor" descrita por Borer et al. (1974). Essa fórmula se mostra mais eficiente que as demais, por não ser uma equação empírica e levar em consideração a concentração de sais. A Tm ótima fornecida pelo programa foi de 56,6°C.

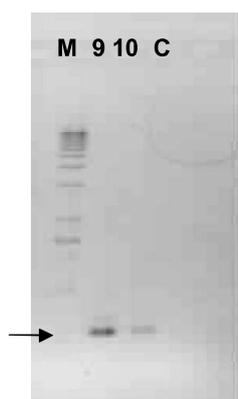
Geralmente, os programas computacionais não reservam pares com homologia no terminal 3', assim as possibilidades da formação de produtos com dímeros de iniciadores são extremamente reduzidas (CHOU et al., 1992).

O par de iniciadores escolhido inicia a amplificação na base 45 e se encerra na base 722, fornecendo um produto de 678 nucleotídeos com 50,4% de concentração GC e Tm de 79,6°C.

### Amplificação por PCR e otimização da reação

Na primeira reação realizada verificou-se a presença de uma banda, o que caracteriza a amplificação, porém observou-se um arraste vertical indicando uma possível inespecificidade na reação. Segundo Rychlik et al. (1990) a especificidade da amplificação depende principalmente das condições empregadas na etapa de anelamento. Como esta etapa envolve a hibridação de oligonucleotídeos, a otimização da temperatura de anelamento (Ta) representa um fator essencial para o sucesso do processo. Visando sanar esse problema, foram feitas outras reações alterando o número de ciclos, a temperatura de anelamento e a concentração de alguns reagentes.

O melhor padrão de banda obtido foi na nona reação realizada em que o volume final foi 20 µL, contendo 0,2 µL do DNA extraído; 2 µL de tampão para PCR (Gibco BRL); 0,5 µL de dNTPs; 0,2 µL de MgCl<sub>2</sub>; 16,2 µL de dH<sub>2</sub>O; 0,3 µL de cada iniciador; e 0,3 µL de Taq Polimerase (Gibco BRL). Utilizou-se um programa de 1 minuto a 94°C, seguido de 38 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e um ciclo final de 7 minutos a 72°C (figura 1).



**Fig. 1.** Padrão de bandas da otimização da PCR. O melhor padrão de amplificação foi obtido na reação 9. As duas reações foram submetidas à temperatura de anelamento de 60°C em 38 ciclos e com extensão final de 7 minutos a 72°C. **M** é o marcador padrão 1Kb, **C** é o controle da reação.

### Conclusões

Os iniciadores  $\alpha S$  5' TCT CAC CCT CGC AAA CTC AG 3' e  $\alpha A$  5' TTG AGG ACG ATG TTG GAA CG 3' mostraram boa especificidade e reprodutibilidade na amplificação do gene  $\alpha AI-1$ . Podendo, assim, serem usados como marcadores funcionais do gene de resistência ao caruncho em outras culturas, tais como o feijão-caupi, pois segundo Malvas (2003) existem similaridades estruturais entre genes de resistência de diferentes espécies vegetais, permitindo a identificação destes genes por meio de PCR.

## Referências

- BORER, P.N.; DENGLER, B.; TINOCO JUNIOR, I.; UHLENBECK, O. C. Stability of ribonucleic acid and double-stranded helices. **Journal of Molecular Biology**, v. 86, p. 843-853, 1974.
- CHOU, Q.; RUSSEL, M.; BIRCH, D. E.; RAYMOND, J.; BLOCH, W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy number amplifications. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p. 1717-1723, 1992.
- COUTINHO, M. V.; COSTA, M. F.; CABRAL, G. B.; SÁ, M. F. G. **Regeneração de plantas de feijão azuki (*Vigna angulkaris*) via organogênese direta**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 10 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular técnica, 27).
- DIEFFENBACH, C. W.; LOWE, T. M. J.; DVEKSLER, G. S. General concepts for PCR design. **PCR Methods and applications**, v. 3, p. 530-537, 1993.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 1, p. 13-15, 1991.
- INNIS, M. A.; GELFAND, D. H. Optimization of PCRs. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to the methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 3-12.
- MALVAS, C. C. **Clonagem e caracterização genética de locos homólogos a genes de resistência em Brassica oleraceae L e Zea mays L**. 2003. 79 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MBATA, G. N. Evaluation of susceptibility of varieties of cowpea to *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Callosobruchus subinnotatus* (Pic.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 29, p. 207-213, 1993.
- NEWTON, C. R.; GRAHAM, A. **PCR – Polymerase Chain Reaction**. Oxford: Bios, 1994.
- RYCHLIK, W.; SPENCER, W. J.; RHOADS, R. E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6409-6412, 1990.