

CONSTRUÇÃO DE MACROARRANJOS DE cDNA DE CAFÉ, PARA A IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE INTERESSE AGRONÔMICO

Felipe VINECKY, E-mail: vinecky@cenargen.embrapa.br; Natália G. VIEIRA; Daniela L.A. FERREIRA; Luciana P. FREIRE; Pierre MARRACCINI; Felipe R. DA SILVA; Alan C. ANDRADE

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia –NTBio, Brasília-DF

Resumo:

Para a construção dos macroarranjos, foi gerado inicialmente um conjunto não redundante de clones (Unigene), resultante da análise do banco de dados gerado no projeto Genoma Café. Utilizando-se um sistema automatizado para o rearranjo (Q-Bot), um conjunto não redundante com aproximadamente 33 mil clones foi rearranjado, perfazendo um total de 86 placas de 384 poços. O DNA plasmidial de todo esse conjunto de clones (33 mil), foi extraído e amostras representativas de cada uma das placas foi analisada por eletroforese em gel de agarose. Com o objetivo de se ter uma idéia do resultado do rearranjo, 4 clones aleatórios (1 clone/ quadrante de 96) de cada placa de 384 foram seqüenciados e comparados por análises de BlastN na Base de Dados do Genoma Café, para a confirmação da identidade dos clones. Do total de seqüências analisado, verificou-se uma porcentagem de 8% de erros ocorridos no rearranjo. Essas placas foram rearranjadas e amostras, novamente seqüenciadas. Após essa etapa, as membranas serão construídas e o presente trabalho teve como objetivo, avaliar a metodologia para a construção de macroarranjos, em escala piloto, para se determinar as melhores condições para a impressão de DNA nas membranas do Unigene Café. Foram avaliados os parâmetros, tipo de DNA a ser impresso (DNA plasmidial vs. Produto de PCR) e a concentração a ser utilizada. De modo geral, a impressão das membranas utilizando-se o equipamento Q-Bot (Genetix) foi bastante uniforme entre as repetições, apresentando muito baixa variação e como esperado, os sinais radioativos apresentados pelos produtos de PCR, foram superiores aos de plasmídeo, devido à razão molar diferente e provável melhor desnaturação devido ao fato de serem fragmentos de DNA lineares.

Palavras-chave: genômica funcional, macroarranjos, transcriptoma, estresses bióticos, estresses abióticos, café

COFFEE cDNA-MACROARRAYS FOR CANDIDATE GENE IDENTIFICATION

Abstract:

To make the Coffee cDNA-Macroarrays, a non-redundant group of clones (Unigene) was initially generated by bioinformatics analysis of the Brazilian Coffee Genome Database. The re-arranging routine was performed with the Q-Bot system (Genetix) and resulted in a non-redundant group of 33,000 clones organized in 86 plates (384). Plasmid DNA from all 33 thousand clones was extracted and representative samples were analyzed by gel electrophoresis. To check the accuracy of the re-arranging routine, 4 samples per plate were sequenced and compared by BlastN analysis against the Coffee Database. The results of this analysis indicated 8 % mistakes during the re-arranging routine. Plates containing mistakes were re-arrayed and novel samples sequenced. The next step for the Macroarray construction is the printing of the membranes and the objective of this work was to establish the best protocol for this routine. The type of DNA (plasmid vs. PCR product) and the concentration were the variables evaluated. The results obtained with the hybridization experiments indicated that in general the printing routine with the Q-Bot system was very uniform and accurate among the replicates. In addition, the data obtained indicated that the radioactive signals obtained with the PCR product-spots were stronger than the ones obtained with plasmid DNA due to the different molar ratio and probably also, due to the better denaturing step of a linear DNA fragment.

Key words: Functional genomics, macroarrays, transcriptional profiling, biotic stress, abiotic stress, coffee

Introdução

O café é um dos principais produtos agrícolas no mundo, sendo produzido por mais de 70 países. Brasil, Vietnã, Colômbia, Indonésia e México são os cinco maiores produtores mundiais, responsáveis por aproximadamente 56% da produção mundial, sendo o Brasil o mais importante, com uma produção que chega a ser três vezes acima que a do segundo colocado, a Colômbia (ICO, 2007). A previsão do mercado para os próximos anos é de déficit de produção comparado à demanda crescente do produto. Isto representa uma oportunidade para o Brasil consolidar a sua liderança no mercado mundial e continuar atendendo às necessidades do mercado interno. Não somente somos os maiores produtores mundiais como também apresentamos altas taxas de crescimento de produção.

Tendo em vista a importância da cultura do café na produção agrícola brasileira e à necessidade de soluções para os constantes desafios tecnológicos que enfrentam uma cafeicultura nacional competitiva e sustentável, o apoio ao desenvolvimento científico e tecnológico do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café-CBP&D-Café, tem sido de fundamental importância para os avanços científicos e progressos tecnológicos alcançados na cafeicultura, nos últimos anos. Uma dessas conquistas foi a conclusão do projeto Genoma Café (Vieira et al, 2006) que abre novas perspectivas para os programas de melhoramento genético desta cultura perene.

Com a conclusão do projeto Genoma Café, está disponível um banco de dados contendo uma parcela significativa dos genes expressos em café (transcriptoma), relacionados às diversas condições de estresse submetidas e aos órgãos/tecidos utilizados na construção das bibliotecas. No entanto, além da geração de um banco de ESTs, torna-se necessário a realização de uma análise prospectiva e discriminatória dos fatores genéticos determinantes ou associados com determinadas características fenotípicas de interesse agrônomo (tais como tolerância aos estresses bióticos e abióticos, florescimento e maturação uniformes, qualidade e aroma, etc). Essas análises serão realizadas através de hibridizações de macroarranjos com sondas marcadas radiotivamente, sintetizadas a partir de mRNA obtido de genótipos contrastantes para a característica em estudo e/ou submetidos a diferentes tratamentos (Controle/Tratamento). Desta forma, será possível realizar uma análise comparativa dos transcriptomas de café, o que possibilitará a identificação dos fatores genéticos associados à característica agrônoma em estudo. Estes conjuntos de membranas (Macroarranjos) serão então, distribuídos para a realização dos experimentos de hibridização. Estes experimentos de hibridização serão realizados por grupos de pesquisadores distribuídos em pólos de pesquisa em melhoramento genético e biotecnologia do cafeeiro, com membros nas principais regiões produtoras de café (Sudeste, Sul e Centro-Oeste). Todos os resultados das análises serão centralizados e organizados em uma base de dados única, localizada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, o que facilitará a integração e o acesso às informações geradas.

Espera-se que a utilização dos macroarranjos facilite a identificação de novos genes com potencial utilização como marcadores em programas de seleção assistida, ou com potencial aplicação em biotecnologia. O conhecimento gerado terá, sem dúvida, impacto em outras áreas do conhecimento tais como fisiologia e bioquímica vegetal, resultando em maior entendimento da biologia e bases moleculares das interações agrônomicas de uma das mais importantes espécies cultivadas da agricultura brasileira. Mais importante, o aparelhamento das equipes, seu treinamento em genômica e a consolidação da rede de colaboração técnico-científica levará a um salto qualitativo na pesquisa genética do cafeeiro no Brasil.

Material e Métodos

Preparação das amostras

O DNA plasmidial de 18 clones selecionados aleatoriamente, foi extraído e quantificado por análises em espectrofotômetro e avaliados por eletroforese em gel de agarose. As concentrações foram padronizadas para 500 ng/ μ l e 75 μ l de cada amostra foi depositado em placas de elisa. Após a adição de 75 μ l de DMSO em cada amostra, 50 μ l foram transferidos para os poços correspondentes das fileiras E e F da placa, para a obtenção de amostras duas vezes diluídas, conforme indicado na figura 1. Produtos de PCR das amostras de DNA plasmidial foram obtidos a partir de amplificações utilizando-se um termociclador PTC-100 (MJ Research), com parâmetros padrão de ciclagem e os primers M13 reverso e M13 direto. Os produtos de PCR foram purificados, quantificados e alíquotas foram arranjadas na placa de elisa, da mesma forma descrita para as amostras de DNA plasmidial.

Impressão das amostras

Foi utilizado o equipamento Q-BOT (Genetix) para a impressão das amostras em variações de 2, 4 e 8 toques e também, duas e quatro repetições. O objetivo dessas variações foi o de se avaliar a sensibilidade de quantificação após as hibridizações das membranas. As membranas foram fixadas conforme protocolos estabelecidos pelo fabricante.

Hibridizações e análises dos resultados

Um fragmento de 432 pb obtido após a restrição enzimática de DNA plasmidial do vetor pSportI com PvuII foi utilizado para a construção de uma sonda marcada com [α -³²P]dCTP. Após hibridização por 14 horas à 65°C, utilizando o tampão "Modified Church Buffer", as membranas foram lavadas por 5 vezes/15 min. em solução de 0,1% SSC + 0,1% SDS, à mesma temperatura de hibridização. As análises de quantificação foram realizadas após 24 horas de exposição, utilizando-se o sistema de análises Phosphorimager FLA3000 (Fuji) e os softwares MultiGauge e ArrayGauge.

Resultados e Discussão

Os resultados apresentados nas figuras 2 e 3, indicam que a metodologia utilizada na construção dos arranjos de DNA foi eficiente, com os melhores resultados obtidos com produtos de PCR. A metodologia utilizada na impressão das membranas, utilizando-se o equipamento Q-Bot (Genetix) foi bastante uniforme entre as repetições, apresentando muito baixa variação.

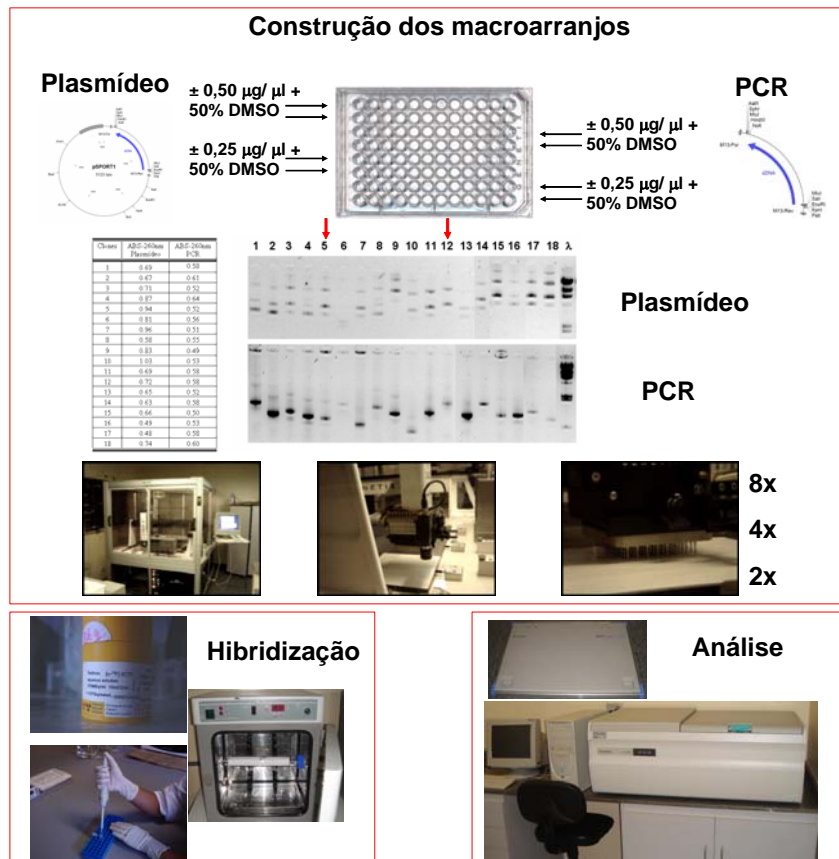


Figura 1. Diagrama contendo as etapas para a construção dos macroarranjos, especificando os parâmetros testados na avaliação da metodologia.

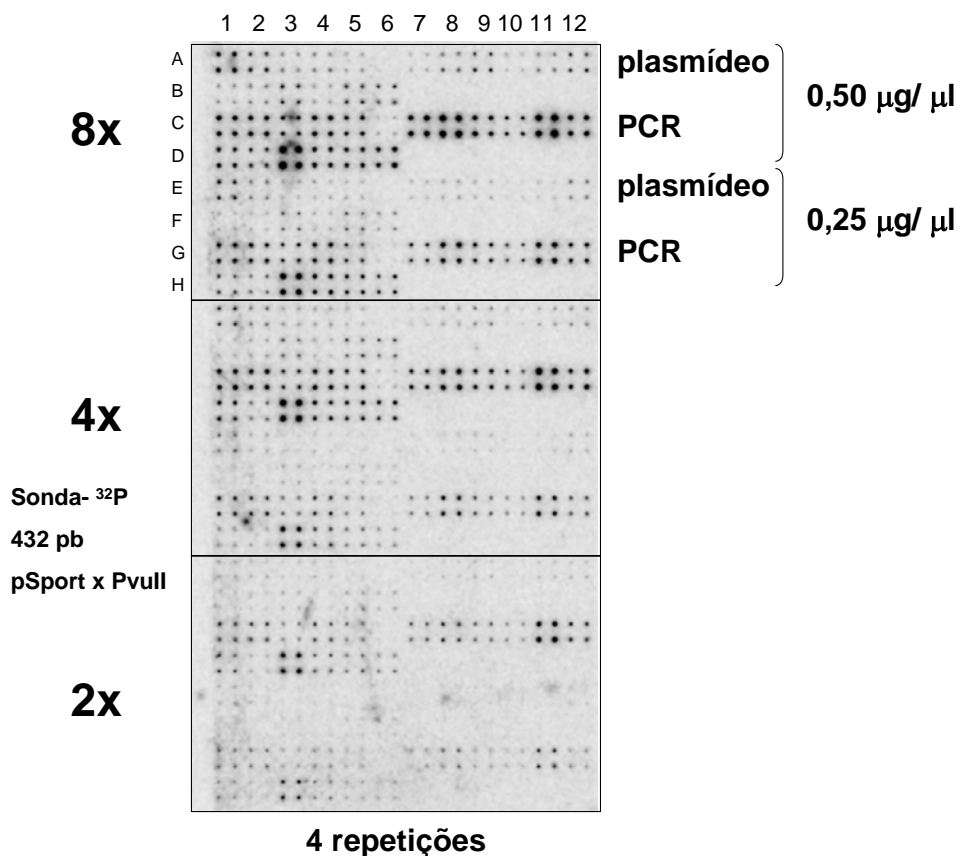


Figura 2. Resultados obtidos após a hibridização da membrana com a sonda 432pb-pSportIxPvuII.

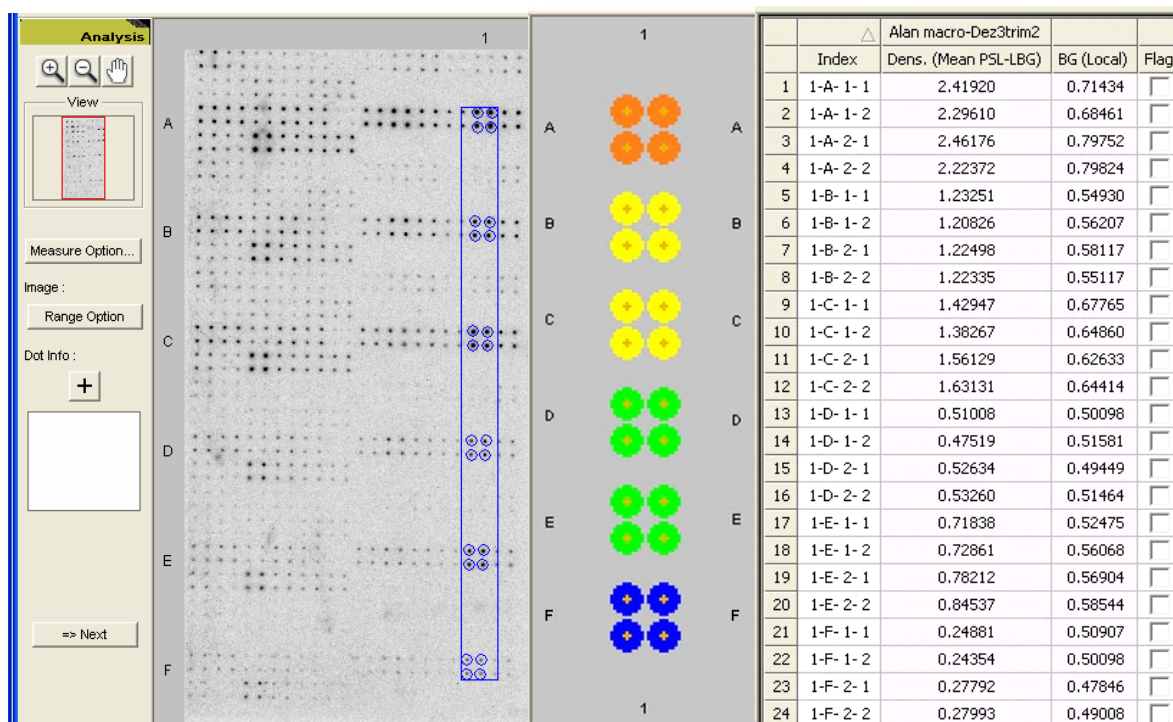


Figura 3. Dados de quantificação obtidos após a hibridização e análise da membrana com os softwares MultiGauge e ArrayGauge. Foi utilizado o método de background local nas análises de quantificação.

Conclusões

De modo geral, os sinais radioativos apresentados após as hibridizações, corresponderam com as variações de concentração detectadas em gel de agarose, com algumas exceções. Como esperado, os sinais radioativos apresentados pelos produtos de PCR, foram superiores aos de plasmídeo, provavelmente devido à razão molar diferente. As análises de quantificação, utilizando-se 24 horas de exposição, o Phosphoimager FLA3000 (Fuji) e os softwares MultiGauge e ArrayGauge, apresentaram bons resultados e foram eficientes em estratificar as classes de diluição utilizadas. A metodologia utilizada na impressão das membranas, utilizando-se o equipamento Q-Bot (Genetix) foi bastante uniforme entre as repetições, apresentando muito baixa variação.

Referências Bibliográficas

ICO. International Coffee Organization statistical database. <http://www.ico.org/prices/m1.htm> . 2007. Citação eletrônica.

Vieira L.G.E. *et al.* (2006). Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Braz J Plant Physiol* 18: 95-108.