

## Comunicação Técnica:

### PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DO RT-PCR UTILIZADO PARA IDENTIFICAÇÃO DO mRNA DA $\alpha$ -AMILASE EM SEMENTES DE MILHO<sup>1</sup>

BÁRBARA FRANÇA DANTAS<sup>2</sup>, CARLOS ALBERTO ARAGÃO<sup>3</sup>, JOÃO PESSOA ARAÚJO-JUNIOR<sup>4</sup>, JOÃO DOMINGOS RODRIGUES<sup>5</sup>, CLÁUDIO CAVARIANI<sup>6</sup>, JOÃO NAKAGAWA<sup>6</sup>

**RESUMO** - Durante a germinação das sementes, os carboidratos de reserva são degradados pela atividade de  $\alpha$ -amilase. A identificação de mRNA é uma ferramenta fundamental para a definição da cinética de síntese de  $\alpha$ -amilase. Objetivou-se padronizar a metodologia do RT-PCR para identificar o mRNA do gene de  $\alpha$ -amilase em sementes de milho. Após três dias de germinação das cultivares Saracura-BRS 4154 e CATI-AL34, extraiu-se o RNA total pelo método do tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio, com algumas modificações. A partir do RNA total extraído foi obtido cDNA com utilização de “random primers”. A amplificação por PCR de uma porção do gene da  $\alpha$ -amilase foi realizada com os “primers”: “sense” - CGACATCGACCACCTCAAC; “antisense” - TTGACCAGCTCCTGCCTGTC; gelatina; DMSO e 1,25 unidades de *Taq* DNA polimerase por reação e completados com água tratada com DEPC. Os ciclos para a amplificação foram 94°C durante 4 minutos, seguidos por 34 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 42°C durante 1 minuto e 72°C durante 1,5 minutos e, finalmente, 72°C por 5 minutos. O produto do RT-PCR apresentou uma banda de 249 pares de base (pb) bem definida, para as duas cultivares estudadas, não ocorrendo bandas inespecíficas. A técnica do RT-PCR mostrou ser uma metodologia eficiente para a identificação da expressão de  $\alpha$ -amilase durante a germinação das sementes e pode ser usado para estudo qualitativo e quantitativo da cinética de síntese dessa enzima em experimentos de germinação.

Termos para indexação: *Zea mays*, sementes,  $\alpha$ -amilase, RT-PCR.

#### RT-PCR PATTERNING FOR $\alpha$ -AMYLASE MESSENGER RNA IDENTIFICATION IN GERMINATING MAIZE SEEDS

**ABSTRACT** - During germination the seed reserve carbohydrates are degraded by  $\alpha$ -amylase activity. The identification of mRNA is a very important tool for definition of  $\alpha$ -amylase synthesis kinetics. This study aimed to adapt a RT-PCR methodology for  $\alpha$ -identification of amylase mRNA in germinating maize seeds. After three days germination of Saracura BRS4154 and CATI AL34 maize cultivars, the total RNA was isolated by the guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method, with some modifications. The cDNA was obtained from the total RNA, using random primers. The  $\alpha$ -amylase gene PCR amplification was carried out with cDNA, primers (sense - CGACATCGACCACCTCAAC; antisense - TTGACCAGCTCCTGCCTGTC); gelatin; DMSO and 1,25 units of *Taq* DNA polimerase per reaction and complete with DEPC water. The amplification cycles were 94°C/4 minutes, 34 cycles of 94°C/1 minute, 42°C/1 minute

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 23/09/2002.

<sup>2</sup> Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> MSc. Doutoranda, Pesquisadora, EMBRAPA/CPATSA, Cx. Postal 23, 56300-970, Petrolina-PE; e-mail: barbara@cpatsa.embrapa.br

<sup>3</sup> Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>, Msc., Doutorando, Prof. Departamento de Tec. e Ciências Sociais, FAMESF, UNEB, Juazeiro-BA.

<sup>4</sup> Médico Veterinário, Dr., Prof. Departamento de Microbiologia e Imunologia IB, UNESP, Botucatu-SP.

<sup>5</sup> Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>, Dr., Prof. Departamento de Botânica, IB, UNESP, Botucatu-SP.

<sup>6</sup> Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>, Dr., Prof. Departamento de Produção Vegetal, FCA, UNESP, Botucatu-SP.

and 72°C/1,5 minutes, and finally 72°C/5 minutes. The RT-PCR product visualization in agarose gel electrophoresis indicated that this method presented well defined bands of 249 bp for the both the cultivars, without unspecific bands. The RT-PCR is an efficient method for  $\alpha$ -amylase expression studies during germination and can be used as a tool for quantitative and qualitative research about  $\alpha$ -amylase synthesis kinetics.

Index terms: seeds, *Zea mays*,  $\alpha$ -amylase, RT-PCR.

## INTRODUÇÃO

O termo “qualidade das sementes” envolve aspectos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários (Carvalho & Nakagawa, 2000) que, avaliados de maneira integrada, propiciam o conhecimento do valor real e do potencial de utilização de um lote de sementes.

A pesquisa na área de biologia molecular associada ao controle de qualidade de sementes tem evoluído rapidamente e novas técnicas têm-se mostrado úteis na obtenção de classes distintas de marcadores moleculares. Estes auxiliam na elucidação dos fatores que afetam a qualidade, a manipulação, a identificação e preservação do material genético, permitindo o monitoramento de todo o processo produtivo.

Segundo Carvalho et al. (2000) várias pesquisas têm sido desenvolvidas para detectar as diversas reações metabólicas que envolvem síntese e degradação de moléculas durante o desenvolvimento, a germinação e a deterioração de sementes.

Esses mesmos autores afirmam que durante a fase de maturação das sementes, a análise do acúmulo de materiais de reserva por meio de marcadores moleculares pode fornecer indícios da qualidade das sementes e que a atividade da enzima  $\alpha$ -amilase tem sido utilizada como marcador relacionado com a tolerância à secagem de sementes de milho.

Durante a germinação das sementes, as reservas insolúveis de alto peso molecular são degradadas e convertidas a formas solúveis, que são rapidamente transportadas aos tecidos em crescimento e utilizadas em reações de síntese ou de produção de energia. As modificações metabólicas que ocorrem nesses estágios são resultados da atividade de várias enzimas de hidrólise e transferência (Bewley & Black, 1985). A  $\alpha$ -amilase tem um papel fundamental nesse processo por catalizar clivagens endoglicolíticas ao acaso das ligações  $\alpha$ -1,4 entre os resíduos de glicose das cadeias de amilose e amilopectina que compõem as reservas de amido de sementes de cereais (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1978). São vários os fatores que influenciam na síntese e atividade de  $\alpha$ -amilase durante a germinação das sementes e grande número de estudos de caracterização e expressão de  $\alpha$ -amilase tem sido conduzidos em cevada, trigo e arroz (Fincher, 1989). No milho,

no entanto, existem poucos trabalhos sobre os processos de transcrição, tradução e ativação dessa enzima durante a germinação.

Muitas pesquisas têm sido realizadas utilizando a técnica da transcrição reversa acoplada com a reação de polimerase em cadeia, comumente chamada de RT-PCR (“Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction”). Carlson & Chouery (1998) utilizaram a RT-PCR para estudar a função da enzima invertase em sementes de mutantes *mm1* de milho. Li (1998) utilizou essa técnica em combinação com análise de enzimas de restrição para diferenciar entre a expressão de genes *ltk*, responsáveis pela transdução de sinais durante o desenvolvimento do endosperma das sementes de milho.

A utilização de técnicas de identificação de RNA mensageiro (mRNA) durante o processo de germinação pode definir a cinética de produção de  $\alpha$ -amilase, bem como a influência de fatores abióticos (umidade, temperatura) na atividade dessa enzima e, conseqüentemente, na germinação das sementes. No entanto, poucos trabalhos são realizados com o objetivo de se definir a expressão do gene de  $\alpha$ -amilase em sementes de milho (Mundy et al., 1985; Sanwo & Demason, 1993; 1994; Sachs et al, 1996). O presente trabalho teve como objetivo padronizar a metodologia da técnica do RT-PCR utilizada na identificação do mRNA produzido a partir do gene de  $\alpha$ -amilase durante a germinação de sementes de milho.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Sementes do Departamento de Agricultura da Faculdade de Ciências Agrônomicas e no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu-SP, nos meses de janeiro a maio de 2001.

Sementes de milho das cultivares Saracura-BRS 4154 e CATI-AL34 foram distribuídas em caixas plásticas tipo “gerbox” sobre duas camadas de papel mata-borrão e colocadas em germinador a 27°C, no escuro, durante 3 dias. Após esse período foi realizada a extração do RNA total, segundo método do tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio proposto

por Chomczynski & Sacchi (1987), com algumas modificações. Os escutelos e embriões das sementes foram macerados em 2 mL de solução desnaturante composta por 4 mol.L<sup>-1</sup> de tiocianato de guanidina; 25 mmol.L<sup>-1</sup> do tampão citrato de sódio, pH 7,0; 0,5% sarcosil e 0,1 mmol.L<sup>-1</sup> 2-mercaptoetanol, utilizando-se almofariz e pistilo até a formação de uma suspensão homogênea. Essa suspensão foi transferida para tubos de 1,5 mL, sendo então adicionados mais 500  $\mu$ L de solução desnaturante; 50  $\mu$ L do tampão acetato de sódio 2 mol.L<sup>-1</sup>, pH 4,0 e 500  $\mu$ L de fenol saturado em água.

As amostras foram centrifugadas a 12000 xg durante 10 minutos a 4°C, coletando-se o sobrenadante. Foram adicionados 200  $\mu$ L de cloróformio às amostras, homogeneizadas e incubadas no gelo, durante 15 minutos. Estas foram então centrifugadas a 12000 xg durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e o RNA foi precipitado em 500  $\mu$ L de isopropanol. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente durante 10 minutos e centrifugadas a 12000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido sendo mantido o precipitado contendo RNA total. O RNA total foi lavado em etanol 75% por centrifugação a 7500 xg por 5 minutos a 4°C e dissolvido em 100  $\mu$ L de água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato), contendo 10 unidades de inibidor de RNase (RNAguard<sup>®</sup>) e incubado a 56°C durante 10 minutos.

Para comparação com este método, foi realizada extração do RNA total utilizando-se o reagente Trizol<sup>®</sup>, conforme instruções do fabricante (GIBCO BRL<sup>®</sup>).

A partir do RNA total extraído foi obtido cDNA adicionando, em tubos de 500  $\mu$ L, 1  $\mu$ L de “random primer” (75 ng); 2  $\mu$ L do inibidor de RNase (20 unidades); 1  $\mu$ L de gelatina 1%; 1-5  $\mu$ g RNA total e completados para 12  $\mu$ L com água tratada com DEPC, sendo incubados a 70°C durante 10 minutos e resfriados a 4°C. Foi adicionado 5  $\mu$ L de tampão 5X First Strand<sup>®</sup> (250 mmol.L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8,3, 375 mmol.L<sup>-1</sup> KCl, 15 mmol.L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>); 2  $\mu$ L de 0,1 mol.L<sup>-1</sup> DTT e 1  $\mu$ L de 10 mmol.L<sup>-1</sup> de dNTP. Após incubação a 42°C durante 2 minutos foram adicionadas 20 unidades de transcriptase reversa (SUPERScript<sup>®</sup> II, GIBCO BRL<sup>®</sup>, Life Technologies) e agitado. O meio de reação foi, então, incubado a 25°C por 5 minutos; 42°C por 50 minutos; 70°C por 15 minutos e resfriadas a 4°C.

A amplificação por PCR do gene de  $\alpha$ -amilase foi realizada em volume total de 25  $\mu$ L contendo 3  $\mu$ L do cDNA obtido anteriormente; 2,5  $\mu$ L de tampão PCR buffer<sup>®</sup> (200mmol.L<sup>-1</sup>TRIS-HCl pH8,4, 500mmol.L<sup>-1</sup> KCl); 100  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup> dNTP; 1,5 mmol.L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>; 0,6  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup> de cada “primer” (“sense”- CGA CAT CGA CCA CCT CAA C;

“antisense” - TTG ACC AGC TCC TGC CTG TC); 4% DMSO; 1,25 unidades de *Taq* DNA polimerase (GIBCO BRL<sup>®</sup>) por reação e completados com água tratada com DEPC.

Além desses reagentes, foram adicionados 0,01% gelatina e 4% DMSO ao meio de reação para avaliar o efeito dessas substâncias na eficiência da amplificação.

Foi colocada nos tubos, em seguida, uma gota de óleo mineral. Os ciclos para a amplificação foram 94°C durante 4 minutos, seguidos por 34 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 42°C durante 1 minuto e 72°C durante 1,5 minutos e finalmente 72°C por 5 minutos. As amostras foram então resfriadas a 4°C.

Os “primers” foram selecionados a partir da seqüência do gene  $\alpha$ -amilase (Acesso L25805, Young et al., 1994) utilizando o software Gene Runner<sup>®</sup> (Figura 1).

A identificação do fragmento amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% e coloração com brometo de etídio.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

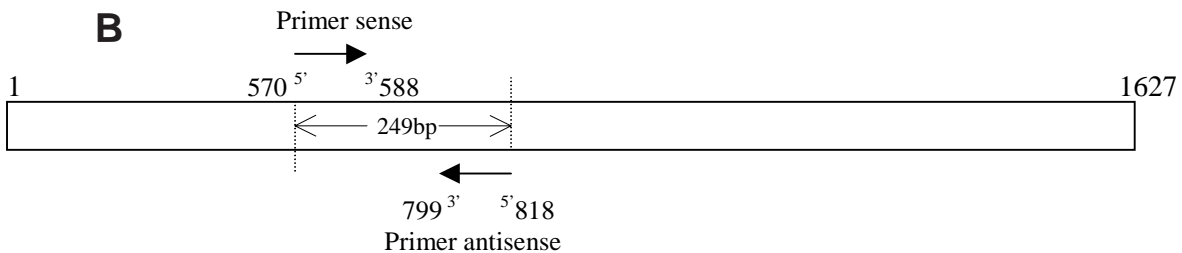
A extração do RNA total pelo método proposto por Chomczynski & Sacchi (1987), com as soluções utilizadas preparadas no próprio laboratório, foi mais eficiente que o uso do kit de extração Trizol<sup>®</sup>. Devido à alta concentração de CG (67%) do produto de RT-PCR (Figura 1a) as fitas de cDNA não se separam facilmente, não havendo amplificação, conforme observado em testes anteriores (dados não publicados). A adição de DMSO 4% ao meio de reação propiciou melhor separação das fitas de cDNA, permitindo o anelamento dos “primers” e uma amplificação satisfatória. A obtenção de cDNA com transcriptase reversa foi mais eficiente com a utilização do “random primer” do que quando foi utilizado oligoDT, devido ao tamanho do gene de  $\alpha$ -amilase, 1627 pb (Figura 1, Young et al., 1994). O “primer” oligoDT inicia a transcrição reversa na cauda poli-A do mRNA (1605<sup>3'</sup>-1621<sup>5'</sup>), e a enzima transcriptase reversa não consegue transcreever todo o gene. Os “primers” selecionados para o PCR propiciaram o aparecimento de apenas uma banda de 249 pb, sendo específicos para o gene de  $\alpha$ -amilase, uma vez que o cDNA foi obtido a partir do RNA total (Figuras 1 e 2). O produto do RT-PCR observado nas duas cultivares foi uma banda de 249 pb bem definida e sem a presença de bandas inespecíficas (Figura 2).

Pode-se concluir, portanto, que o RT-PCR é uma eficiente metodologia para a identificação da expressão de  $\alpha$ -amilase durante a germinação das sementes.

**A**

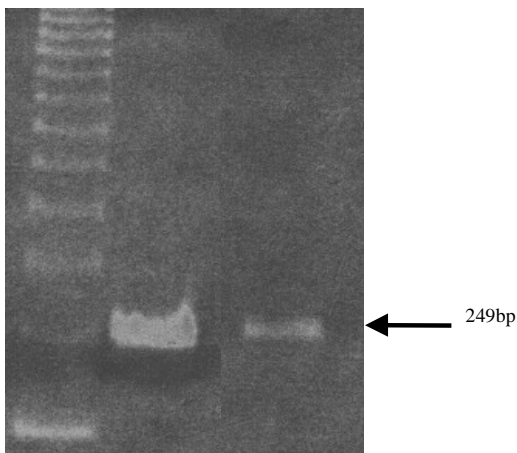
```

1 ttgctgctgc acggagaaga aaaaaaaaaac aggcactgag ctgagatggc gaagcacttg
61 gctgccaatgt gcaggtgcag cctcctagtg cttgtactgc tctgcttggg ctcccagctg
121 gcccaatccc aggtcctctt ccagggttcc aactggggagt cgtggaagaa gcaaggtggg
181 tggtaaacct acctcctggg gcgggtggac gacatcgccg cgacggggccacgcacgtc
241 tggctccccg cgcctgca ctcgggtggc ccgcagggtt acatgcccg cgggtctac
301 gacctggacg cgtccaagta cggcaccac gcggagctca agtcgctcac cgcggcggtc
361 cagccaagg gcgtcaagtg cgtcgccgac gtcgtgatca accaccgctg cgcgactac
421 aaggacggcc gcggcatcta ctgcttctc gagggcggca cccccacagccgcctcgac
481 tggggccccg acatgatctg cagcgacgac acgcagtactccaacgggcccgggcaccgc
541 gacacggggg cgcacttgc cgcgcgccc gacatcgacc acctcaaccgcccgtgcag
601 caggagctct cggactggct caactggctc aagtccgacc tcggcttga cggctggcgc
661 ctgacttcg ccaagggcta ctccgccc gtcgccaagg ttagctgca cagcaccgc
721 cccaccttcg tcgtgccga gatatggagc tcctccact acgacggcaa cggcgagccg
781 tccagcaacc aggcacccga caggcaggagctgtaactgggcccaggggtggggggc
841 cccgccggc cgttcgactt caccaccaagggcgtgctgcaggcggccgt ccagggcgag
901 ctgtggcgca tgaagacgg caacggcaaggcggcgggatgatcggtg gctgccggag
961 aagccgctca cgttcgca caaccacgac accggctcca cgcagaacte gtggccattc
1021 cctccgaca aggtcatgca gggctacgcc tatactctca cgcaccaggaactccatg
1081 atctctacg accacgtttt cgactggaac ctgaagcagg agatcagcgcgctgtctgcg
1141 gtgaggtcaagaaacgggatccaccggggagcagctga acatcctcgccgcccacggg
1201 gatctctacgccaagattgacgacaag gtcacgtga agatcgggtc acggtacgac
1261 gtcgggaacc tgatcccctc agactccac gccgttccc atggcaaca ctactgctt
1321 tgggagaag acggtctgag agtccacgc gggcggcaccactagactagaccattccg
1381 ccagcaacc cctacagata attctttt caggtcatt ttgaacctgg aaaaagaatt
1441 taagagagc taataaccg gaatacatt gtgtactgag ctcttccacgtaattattg
1501 aaagaagatt ataattttg gatgactat taattatgtt ggcattgggga tttttgtaac
1561 ctcttaaac gaggaataa agactgttc ttattaataa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1621 atctaga
    
```



**FIG. 1. Seqüência do gene de  $\alpha$ -amilase e localização do produto de RT-PCR no gene.**

A - Seqüência do gene proposta por Young et al (1994). “Primers” em negro; B - Esquema representativo da localização do produto de RT-PCR no gene de  $\alpha$ -amilase.



**FIG. 2. Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR demonstrando o produto do gene de  $\alpha$ -amilase de sementes de milho das cultivares Saracura (a) e AL34 (b). A seta indica a banda de 249 pb produzida com os “primers” desenhados.**

## REFERÊNCIAS

- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1985. 367p.
- CARLSON, S.J.; CHOUREY, P.S. Molecular analysis of maize miniature1 seed mutants—a progress report. In: MAIZE GENETICS CONFERENCE. **Abstracts...** Disponível em: < www.agron.missouri.edu/cgi-bin/sybgw\_mdb/ mdb3/Reference/146004 1998.> Acesso em: dia mês abreviado e ano. exemplo:1 out. 2002)
- CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C.; VON PINHO, E.R. Aplicação de técnicas moleculares no controle de qualidade de sementes. **Biociência & Desenvolvimento**, v.3, n.17, p.44-47, 2000. Disponível em < www.biociencia.com.br/ bio/ bio17/ 6.htm, 2000.> Acesso : dia mês abreviado e ano.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes, ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2000.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acidguanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, London, v.162, n.1, p.156-159, 1987.
- FINCHER, G.B. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, n.1, p.305-346, 1989.
- LI, Z. Do members of the ltk gene family transduce signals for endosperm development? In: MAIZE GENETICS CONFERENCE. **Abstracts...** Disponível em: < www.agron.missouri.edu/cgi-bin/sybgw\_mdb/ mdb3/Reference/222863 1998.> Acesso em: dia mês(abreviado) 2002
- MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of plants**. 4ed. Oxford: Pergamon Press 1978. 270p.
- MUNDY, J.; BRANDT, A.; FINCHER, G.B. Messenger RNAs from the scutellum and aleurone of germinating barley encode (1-3, 1-4)- $\beta$ -D-glucanase,  $\alpha$ -amylase and a carboxipeptidase. **Plant Physiology**, Rockville, v.79, n.4, p.867-871, 1985.
- SACHS, M.M.; SUBAIAH, C.C.; SAAB, I.N. Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize **Journal of Experimental Botany**, v.47, n.294, p.1-15, 1996.
- SANWO, M.M.; DEMASON, D.A. Characteristics of  $\alpha$ -amylase during germination of two high-sugar sweet corn cultivars of *Zea mays* L. **Plant Physiology**, v.99, n.7, p.1184-92, 1993.
- SANWO, M.M.; DEMASON, D.A. Gibberellic acid ( $GA_3$ )-induced enhancement of  $\alpha$ -amylase activity in the aleurone of *shrunken-2* maize kernels. **American Journal of Botany**, v.81, n.8, p.987-96, 1994.
- YOUNG, T.E.; DEMASON, D.A.; CLOSE, T.J. Cloning of an  $\alpha$ -amylase cDNA from aleurone tissue of germinating maize seed. **Plant Physiology**, Rockville, v.105, n.2, p.759-760, 1994.

