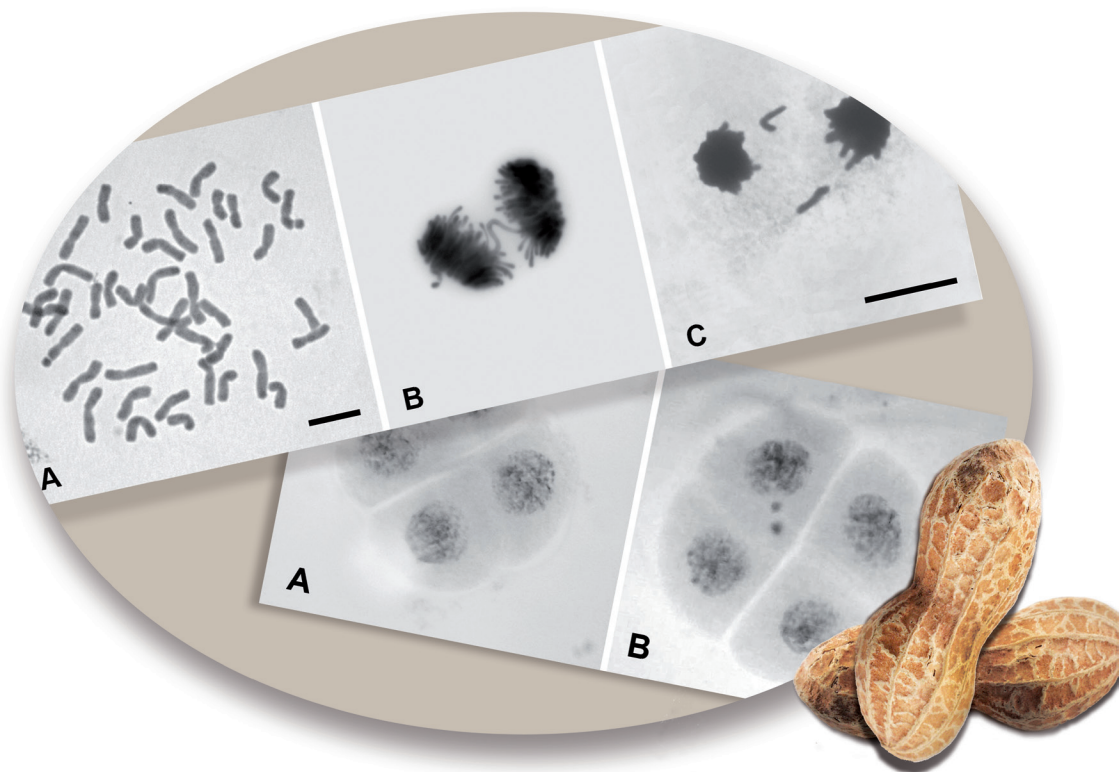


Seleção de genes de referência para estudos de expressão gênica no gênero *Arachis*



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 249

Seleção de genes de referência para estudos de expressão gênica no gênero *Arachis*

Carolina Vianna Morgante
Andressa Cunha Martins
Ana Cláudia Guerra de Araújo
Soraya Cristina de Macêdo Leal-Bertioli
David John Bertioli
Patrícia Messenberg Guimarães
Ana Cristina Miranda Brasileiro

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W5 Norte

Caixa Postal 02372 – Brasília, DF – Brasil – CEP: 70770-917

Fone: (61) 3448-4700 / Fax: (61) 3340-3624

Home page: <http://www.cenargen.embrapa.br/>

E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Lúcio Brunale*

Secretária-Executiva: *Lígia Sardinha Fortes*

Membros: *José Roberto de Alencar Moreira*

Diva Maria de Alencar Dusi

Regina Maria Dechechi G. Carneiro

Samuel Rezende Paiva

Jonny Everson Scherwinski Pereira

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*

Margot Alves Nunes Dode

Normalização: *Lígia Sardinha Fortes*

Revisão de texto: *José Cesamildo Cruz Magalhães*

Editoração eletrônica e capa: *Rafaela Marcondes Oliveira*

Fotos da capa: *Ana Cristina Miranda Brasileiro*

Marisa Toniolo Pozzobon

1ª edição (on line)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

As opiniões nesta publicação são de exclusiva e de inteira responsabilidade dos autores, não exprimindo, necessariamente, o ponto de vista da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Seleção de genes de referência para estudos de expressão gênica no gênero *Arachis*. / Carolina Vianna Morgante ... [et al.].
– Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2009.
27p. – (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 249).

Selection of reference genes for gene expression. Studies in the genus *Arachis*.

1. *Arachis*. 2. Amendoim. 3. Genes de referência - seleção. 4. Expressão gênica. I. Morgante, Carolina Vianna. II. Martins, Andressa da Cunha Quintanda. III. Araújo, Ana Cláudia Guerra. IV. Leal Bertoli, Soraya Cristina de Macedo. V. Bertoli, David John. VI. Guimarães, Patrícia Messemberg. VII. Brasileiro, Ana Cristina Miranda. VIII. Série.

633.368 – CDD 20.

© Embrapa 2009

Sumário

Resumo.....	6
Abstract.....	8
Introdução.....	9
Material e Métodos.....	11
Material Biológico.....	11
Extração de RNA total.....	12
Preparação de <i>pools</i> e tratamentos das amostras com DNase.....	12
Síntese de cDNA e análise de sua qualidade.....	13
Seleção de genes de referência em <i>Arachis</i>	13
Otimização da reação de RT-qPCR com o reagente SYBR® Green...	14
Determinação do fator de diluição do cDNA a ser utilizado na RT-qPCR.....	15
Análise da expressão dos genes constitutivos selecionados.....	15
Resultados e Discussão.....	17
Extração e purificação de RNA total.....	17
Análise da qualidade do cDNA.....	18
Teste dos iniciadores.....	18
Análise da expressão dos genes constitutivos selecionados.....	20
Conclusões.....	22
Referências.....	23

Seleção de genes de referência para estudos de expressão gênica no gênero *Arachis*

Carolina V. Morgante¹

A. C. Martins²

Ana Cláudia Guerra de Araújo³

Soraya Cristina de Macêdo Leal-Bertoli⁴

David John Bertoli⁵

Patrícia Messenberg Guimarães⁶

Ana Cristina Miranda Brasileiro⁷

Resumo

Análises de transcriptoma de espécies vegetais em condições experimentais específicas vêm produzindo informações que permitem melhor entendimento de processos celulares relacionados ao desenvolvimento, à resposta a estresses bióticos e abióticos, ao aumento da produtividade em espécies cultivadas, entre outros. Esses estudos exigem uma etapa adicional de validação dos resultados, que normalmente é realizada pela técnica de RT-qPCR (transcrição reversa do RNA por PCR quantitativo em tempo real). Essa técnica requer a normalização dos níveis de mRNA entre as diferentes amostras analisadas, que é realizada comparando-se a expressão do gene-alvo com a de um gene de referência. Genes constitutivos que atuam em processos celulares básicos são comumente utilizados como genes de referência. No entanto, sua expressão pode ser modulada de maneira espacial e temporal, não havendo um gene de referência universal. Para que a interpretação dos dados gerados pela técnica de RT-qPCR seja consistente, é essencial a identificação de genes de referência que não apresentem variação significativa de expressão entre as amostras.

Este trabalho descreve um protocolo simplificado de quantificação da expressão gênica por RT-qPCR e demonstra a estabilidade da expressão de dois genes de actina de *Arachis* spp. para serem utilizados como genes de referência no gênero.

Palavras-chave: *Arachis*, RT-qPCR, genes de referência, expressão gênica, amendoim.

¹ Bióloga, Ph.D., consultora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Bióloga, mestranda, Universidade de Brasília (UnB)

³ Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵ Botânico, Ph.D., Universidade Católica de Brasília, Universidade de Brasília (UnB)

⁶ Eng. Agrônoma, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁷ Eng. Florestal, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Selection of reference genes for gene expression studies in the genus *Arachis*

Abstract

*Transcriptome analysis of plants in specific experimental conditions have generated crucial information for better understanding cellular processes related to development, stress response, and increase in crop yield. These studies demand an additional step of result validation that is commonly accomplished by RT-qPCR (Reverse Transcription – Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction). This technique requires normalization of mRNA levels between samples that is made by comparing the expression ratio between a gene of interest and a reference gene which is constitutively expressed. Genes involved in basic cellular processes are currently used as reference in this method, but it is known that the expression of these genes may vary in spatial and temporal way, and there is no universal reference gene. For a consistent analysis of RT-qPCR data, the identification of appropriate reference genes, which have stable expression between samples, is essential. In this work, we describe a simplified protocol for quantifying gene expression by RT-qPCR, and we demonstrate the expression stability of two actin *Arachis* genes that can be used as reference in RT-qPCR assays.*

Introdução

Os crescentes estudos de análise de transcriptoma e de expressão gênica em espécies vegetais sob condições experimentais específicas vêm permitindo o acúmulo de informações que permitem o melhor entendimento de processos celulares ligados ao desenvolvimento, à resposta a estresses bióticos e abióticos, ao aumento da produtividade em espécies cultivadas, entre outros. Técnicas como a construção de bibliotecas de cDNA, micro ou macroarranjos de DNA, SAGE (*Serial Analyses of Gene Expression*) (VELCULESCU et al., 1995) e, mais recentemente, o sequenciamento massal (MARGULIES et al., 2005) constituem fonte primária para a análise de padrões específicos de expressão gênica.

Esses métodos de análise de expressão gênica requerem uma etapa adicional de refinamento e validação dos resultados, a qual pode ser realizada por meio de *Northern Blotting*. Porém, esta técnica requer grande quantidade de RNA e é laboriosa. Ultimamente, a técnica mais utilizada é a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), devido à sua alta sensibilidade, praticidade e exatidão (UDVARDI et al., 2008).

A qPCR combina a amplificação de um alvo específico com métodos de quantificação, por meio de medidas da fluorescência associada à síntese de um *amplicon* ao longo dos ciclos da PCR. Essa combinação faz com que a qPCR seja um método sensível, robusto e com boa reprodutibilidade para medidas quantitativas. Essa técnica funciona essencialmente da mesma maneira que a PCR convencional, com ciclos subsequentes nos quais ocorre a desnaturação do DNA, a hibridização de iniciadores de sequências específicas e a extensão, mediada por uma DNA polimerase termoestável, de uma fita complementar, resultando em um aumento exponencial do número de *amplicons* ao longo dos ciclos da reação. No entanto, na qPCR esse aumento é registrado em tempo real ao longo da fase exponencial e não somente ao final

da reação. Detecta-se uma fluorescência que indica a quantidade de *amplicons* acumulados a cada ciclo, que é proporcional à quantidade inicial do DNA alvo.

Para a validação de resultados de análises de transcriptoma, a metodologia empregada é a RT-qPCR (*quantitative reverse transcription PCR*), em que os cDNAs (DNA complementar ao RNA mensageiro) de grupos amostrais distintos são utilizados como molde na reação de qPCR para comparação dos níveis de expressão de genes de interesse. Para que essa comparação seja consistente, é necessária a normalização dos níveis de mRNA entre as diferentes amostras; ou seja, é necessário corrigir possíveis divergências na quantidade de mRNA entre elas. Essa etapa é realizada por meio da comparação da expressão do gene de interesse com a de um gene de referência, cuja expressão não deve variar entre diferentes tecidos, estágios de desenvolvimento ou condições experimentais (GUTIERREZ et al., 2008). Dessa forma, os níveis de expressão do gene de interesse são descritos pela razão entre os níveis de mRNA deste gene e os do gene de referência (HUGGET et al., 2005). Genes envolvidos em processos celulares básicos e que são expressos constitutivamente na célula, como os da actina, ubiquitina e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, são comumente utilizados como genes de referência (CZECHOWSKI et al., 2005). No entanto, estudos indicam que a expressão desses genes constitutivos pode variar, e não há um gene de referência universal para todos os experimentos. Sendo assim, para que a interpretação dos dados tenha o máximo de consistência, o teste e a identificação de genes de referência de boa qualidade – isto é, que não apresentem variação significativa de sua expressão entre as amostras – são etapas essenciais em análises por RT-qPCR. A utilização de múltiplos genes de referência também aumenta a exatidão das análises (VANDESOMPELE et al., 2002). Estudos que buscam identificar os melhores genes a serem utilizados como esse controle interno já foram realizados para diversas espécies vegetais, entre elas *Arabidopsis thaliana* (CZECHOWSKI et al., 2005), arroz (JAIN et al., 2006), cana-de-açúcar (ISKANDAR et al., 2004), soja (LIBAULT et al., 2008) e *Brachiariabrizantha* (SILVEIRA et al., 2009), entre outras.

A equipe do LPP III (Laboratório Planta-Patógeno III) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia desenvolve projetos que visam à prospecção de genes responsivos aos estresses biótico e abiótico em espécies silvestres do gênero *Arachis*. Por meio da construção de bibliotecas de cDNA, genes diferencialmente expressos foram identificados em plantas de *A. stenosperma* infectadas pelo nematoide *Meloidogyne arenaria* e em plantas de *A. magna* submetidas a estresse hídrico. A estratégia foi buscar nas espécies silvestres fonte para o entendimento da resistência ou tolerância aos estresses e, em uma segunda etapa, aplicar esses conhecimentos no melhoramento da espécie cultivada *A. hypogaea*, o amendoim.

Devido à sua origem por poliploidização, *A. hypogaea* apresenta pouca variabilidade genética para caracteres de interesse agrônomo, como, por exemplo, resistência a doenças e produtividade. Programas de melhoramento genético do amendoim tornam-se necessários, uma vez que se trata da quinta oleaginosa mais cultivada no mundo (USDA, 2008). Além de ser consumido *in natura*, o amendoim é matéria-prima para a indústria alimentícia e seu óleo apresenta potencial para ser usado como biocombustível (ROBERSON, 2007).

O presente trabalho propõe um protocolo simplificado para a realização da RT-qPCR, utilizando-se o reagente SYBR como método de detecção, e demonstra a estabilidade de dois genes de referência, testados nas espécies *A. hypogaea*, *A. stenosperma* e *A. magna* em estudos de quantificação da expressão gênica.

Material e Métodos

Material biológico

O material biológico analisado proveio de ensaios de estresses bióticos e abióticos realizados com *A. stenosperma*, *A. hypogaea* e *A. magna*. Plantas de *A. stenosperma* e *A. hypogaea* foram infectadas com juvenis (J2) do nematoide *Meloidogyne arenaria* (PROITE, 2007a) e suas raízes

foram coletadas 2, 4, 9 e 16 dias após a inoculação. O bioensaio de estresse abiótico foi conduzido com plantas de *A. magna* submetidas à redução gradual de rega. Foram coletadas folhas e raízes em quatro pontos nos quais as plantas apresentavam graus variados de estresse hídrico (BRASILEIRO et al., 2008). Após coletadas, as amostras biológicas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

Extração de RNA total

O RNA total de folhas e raízes das espécies *A. magna*, *A. hypogaea* e *A. stenosperma* submetidas a estresses bióticos ou abióticos foi extraído com o reagente Trizol (invitrogen). Os tecidos vegetais foram macerados em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, e seguiu-se o protocolo do fabricante com modificações (BRASILEIRO et al., 2008). A qualidade do RNA extraído foi conferida por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% não desnaturante, corado com brometo de etídio, e por espectrofotometria, utilizando-se o equipamento NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies). Considerou-se como indicação de RNA de boa qualidade amostras que apresentaram razão entre as leituras nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (A260/A280) entre 1,8 e 2,0. Por este último método foi também avaliada a concentração final das amostras.

Preparação de *pools* e tratamentos das amostras com DNase

Após a quantificação das amostras, formaram-se *pools* contendo quantidades iguais de RNA total de cada planta que constituía um determinado ponto, de modo que todas as repetições biológicas estavam igualmente representadas na combinação. Em seguida, os *pools* contendo 100-150 µg de RNA total cada foram purificados em colunas do kit Invitex (Invisorb), seguindo recomendações do fabricante, e a qualidade e quantidade das amostras de RNA foram analisadas conforme descrito acima. Para a eliminação de eventuais contaminações das amostras com DNA genômico, estas foram tratadas com a enzima DNase. Foram utilizados 2 µg de RNA total de cada *pool*

para o tratamento com 2 U de DNase (Invitrogen), em reação com volume final de 10 μ L, que foi incubada durante uma hora a 37°C. Em seguida, a atividade enzimática foi inibida com 1 μ L de EDTA 25 mM durante 10 minutos a 65°C.

Síntese de cDNA e análise de sua qualidade

Todo o volume da reação com a enzima DNase contendo 2 μ g de RNA total foi utilizado diretamente, sem qualquer processo anterior de purificação ou análise, na reação de síntese de cDNA com a enzima transcriptase reversa SuperScript II (Invitrogen), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. Utilizou-se como iniciador o *Anchored Oligo(dT) 20 primer* (Invitrogen). O RNA foi desnaturado durante 5 minutos a 65°C, e a reação de síntese foi realizada a 42°C durante uma hora. Em seguida, realizou-se a inativação da enzima durante 15 minutos a 70°C.

Após a síntese de cDNA, a ausência de contaminação das amostras por DNA genômico foi conferida por meio de RT-PCR, utilizando-se os iniciadores leg 66, leg66-FWD (AGCTCCACCTCTTTCCGACAGA) e leg66-REV (AGTTTCTACAGCACGTATCCTTTCC) (HOUGAARD et al., 2008). A reação foi realizada com a enzima *Taq* DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen) contendo tampão 1x, cloreto de magnésio 1,5 mM, dNTP 0,25 mM, iniciadores (0,3 μ M de cada), 0,5 mg/mL de BSA e 1,5 U de enzima. Utilizou-se 0,5 a 1 μ L de cDNA como molde. A reação foi realizada no termociclador MasterCycler (Eppendorf). O DNA foi desnaturado durante 5 minutos a 94°C, e o ciclo de amplificação foi repetido 30 vezes: 94°C, 1 minuto; 56°C, 1 minuto; e 72°C, 1 minuto. O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

Seleção de genes de referência em *Arachis*

Uma busca por homólogos de genes constitutivos correntemente utilizados como genes de referência em análises por qPCR foi realizada nos bancos de dados de ESTs de *Arachis* (PROITE et al., 2007b; BRASILEIRO et al., 2008). Foram identificados homólogos de genes

como os de RNA ribossomais, actina, ubiquitina e tubulina, entre outros. No presente trabalho, dois genes que codificam actinas, um de *A. magna* e outro de *A. stenosperma*, foram selecionados para análise.

Iniciadores para a amplificação específica de regiões desses genes foram desenhados com o emprego do programa *Primer 3 Plus* (UNTERGASSER et al., 2007). As condições utilizadas no programa foram as seguintes: tamanho do *amplicon* entre 150-200 pb; tamanho dos iniciadores entre 19-22 bases; temperatura de dissociação (T_m) do iniciador entre 59-61°C; e porcentagem de GC presente no iniciador entre 45 e 55%. Os iniciadores para a amplificação dos dois genes selecionados foram os seguintes: act1-FWD (TGGTCTCGGTTTCCTGAGTT), act1-REV (AATACCACTCCAAAGCAAACG), act2-FWD (GAGCTGAAAGATTCCGATGC) e act2-REV (GCAATGCCTGGGAACATAGT). A funcionalidade e especificidade dos iniciadores foram inicialmente testadas por PCR utilizando-se a enzima *Taq* DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. A reação foi realizada no termociclador MasterCycler (Eppendorf). O DNA foi desnaturado durante 5 minutos a 94°C, e o seguinte ciclo foi repetido 30 vezes: 94°C, 40 segundos; 60°C, 40 segundos; e 72°C, 40 segundos. O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

Otimização da reação de RT-qPCR com o reagente SYBR® Green

A reação de qPCR foi realizada no equipamento StepOne (Applied Biosystem), com o reagente Platinum® SYBR® Green qPCRSuperMix-UDG w/ROX (Invitrogen). Este *mix* contém uracila, em vez da base timina, para a síntese de DNA. A reação foi otimizada para um volume final de 10 μ L, em vez dos 50 μ L recomendados pelo fabricante, e realizada com 5 μ L do mix, 0,2 μ M de cada iniciador e 2 μ L de cDNA, na respectiva diluição. A reação foi mantida durante 2 minutos a 50°C para a completa degradação de dsDNA (DNA de fita dupla) contendo

uracila e possíveis contaminantes de reações anteriores; e 10 minutos a 95°C para a ativação da *Taq* DNA polimerase. A seguir, o seguinte ciclo foi repetido 40 vezes: 15 segundos a 95°C para a desnaturação do DNA, e um minuto a 60°C, para a hibridização dos iniciadores e extensão das novas fitas de DNA. Ao final, realizou-se uma curva de dissociação para verificar a especificidade dos iniciadores. Para tanto, a reação foi submetida às seguintes variações de temperatura: 15 segundos a 95°C, um minuto a 60°C e 15 segundos a 95°C. Como controles negativos da reação, foram utilizados o NTC (*No Template Control*), que contém todos os componentes da reação, exceto o cDNA molde, e o NAC (*No Amplification Control*), que contém RNA em vez de cDNA como alvo. Esse último controle permite a identificação de possíveis contaminações com DNA genômico nas amostras de RNA total.

Determinação do fator de diluição do cDNA a ser utilizado na RT-qPCR

Foram realizados *pools* para amostras de *A. magna* e *A. stenosperma*, separadamente, contendo quantidades iguais de cDNA dos diversos pontos de coleta dos ensaios. Esses *pools* foram utilizados para a determinação de uma curva de diluição, com a qual foi possível estabelecer parâmetros como eficiência dos iniciadores e a diluição do cDNA a ser utilizada para a análise por RT-qPCR. Os *pools* de cDNAs foram diluídos a razões de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , e a diluição ideal foi determinada para a obtenção do Ct (número de ciclos da qPCR em que a fluorescência atinge um limiar fixo pré-determinado) com valores entre 18 e 25.

Análise da expressão dos genes constitutivos selecionados

Após a determinação da diluição ideal, as amostras de cDNA foram analisadas separadamente. O mesmo fator de diluição foi utilizado para todas as amostras. O nível de expressão dos genes constitutivos foi estimado em cada ponto de coleta nos diferentes ensaios. As reações foram realizadas com os dois pares de iniciadores descritos acima, e os Cts foram comparados.

Na Figura 1 estão esquematizadas todas as etapas seguidas nos protocolos acima descritos.

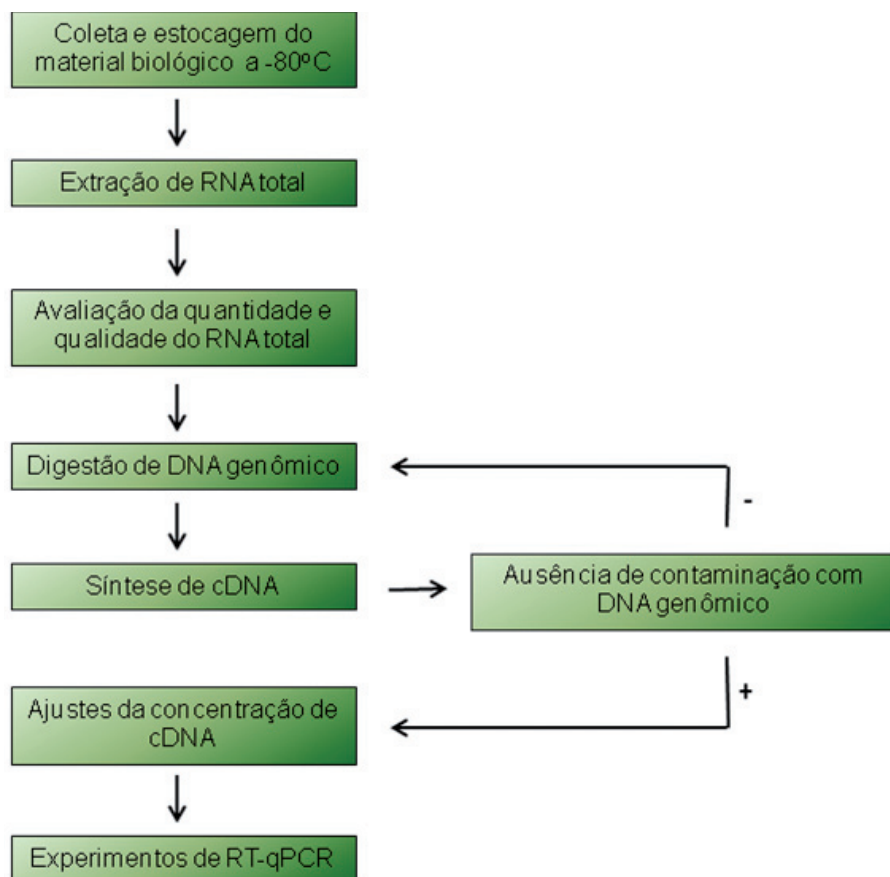


Figura 1. Esquema das etapas do protocolo otimizado para a técnica de RT-qPCR. A ausência de contaminação por DNA genômico foi confirmada pelas técnicas de RT-PCR e RT-qPCR, utilizando-se iniciadores que amplificam uma região intrônica do DNA genômico.

Resultados e Discussão

Extração e purificação de RNA total

O método de extração de RNA total com a utilização do reagente Trizol mostrou-se eficiente para as três espécies em estudo (Figura 2), sem contaminação aparente com DNA genômico e com um rendimento médio de 1 μ g de RNA total por mg de tecido macerado. No entanto, observou-se que o RNA ainda apresentou impurezas, o que dificultou a quantificação precisa das amostras por espectrofotometria. A quantificação do RNA total é etapa essencial em ensaios de medição de expressão gênica pela técnica de RT-qPCR. Quantidades exatas e iguais de RNA de cada amostra devem ser utilizadas para a síntese de cDNA, a fim de que sejam registradas as reais diferenças entre as amostras. Houve, então, a necessidade de purificar o RNA total extraído e, para tanto, utilizou-se o kit Invisorb Spin Plant RNA Mini (Invitex). Esta metodologia ocasionou perda de aproximadamente 30% da quantidade inicial de RNA, porém gerou material com a qualidade necessária para o prosseguimento das análises. Após a purificação, realizou-se a quantificação do RNA, cujo resultado foi conferido por eletroforese em gel não desnaturante de agarose a 1,5% (Figura 3). Pode-se observar que foi possível obter a quantificação das amostras com precisão.

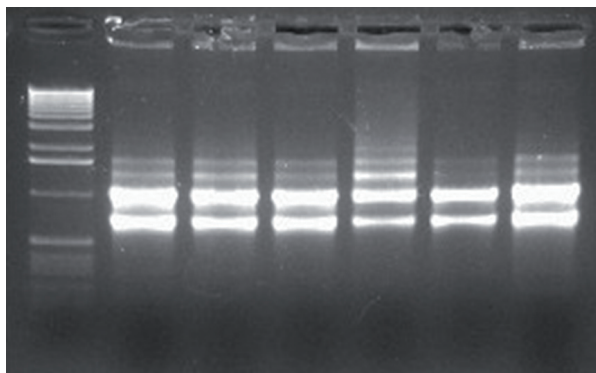


Figura 2. Gel de agarose 1,5% não desnaturante em que foram aplicadas as amostras de RNA total extraídas de raízes de seis plantas de *A. stenosperma*. O marcador molecular, primeiro poço à esquerda, é o 1 Kb Plus (Invitrogen).

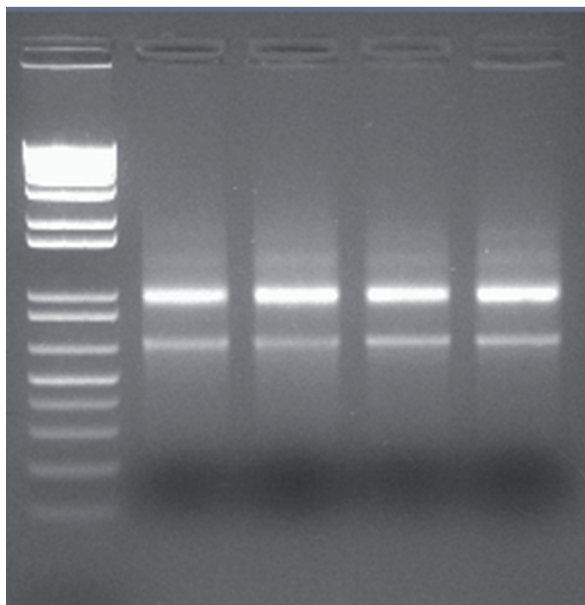


Figura 3. Gel de agarose 1,5% não desnaturante com quatro amostras de RNA total de raiz de *A. magna*, após purificação com o kit Invisorb. Quantidades iguais de RNA de cada amostra foram aplicadas no gel com base na quantificação obtida pelo equipamento NanoDrop. A precisão das medidas pode ser visualizada pela homogeneidade da intensidade das amostras no gel. O marcador molecular, primeiro poço à esquerda, é o 1 kb Plus (Invitrogen).

Análise da qualidade do cDNA

A qualidade do cDNA sintetizado a partir dos *pools* de RNA foi conferida pela técnica de RT-PCR. Utilizaram-se os iniciadores leg66 FWD e VER, que amplificam no DNA genômico uma região que inclui um íntron, gerando um fragmento de aproximadamente 570 pb. Sendo assim, pode-se distinguir o produto amplificado a partir do cDNA, o qual não possui íntron e tem aproximadamente 250 pb, daquele amplificado a partir do DNA genômico (Figura 4). Esta análise, bastante sensível, permite a identificação de eventuais contaminações com DNA genômico nas amostras de cDNA, o que pode comprometer a análise pela técnica de RT-qPCR. Pode-se verificar que o tratamento das amostras de RNA total com DNase foi eficiente, pois nenhuma contaminação por DNA foi identificada.

Teste dos iniciadores

Antes de terem sua expressão quantificada por RT-qPCR, os iniciadores act1-FWD, act1-REV, act2-FWD e act2-VER foram testados pela

técnica de RT-PCR. Pode-se observar que todos os iniciadores funcionaram bem e apresentaram boa especificidade ao cDNA molde, pois não foram observadas amplificações inespecíficas.

A especificidade desses iniciadores foi também conferida pela técnica de RT-qPCR, por meio da análise da curva de dissociação. Para os dois pares de iniciadores, foram observadas curvas com picos únicos e bem definidos, sem picos parasitas, o que indicou a amplificação de apenas um cDNA molde e que não houve a formação de dímeros entre os iniciadores (Figura 5). Esses resultados mostram que os parâmetros utilizados para o desenho dos iniciadores no programa *Primer 3 Plus* foram eficientes.

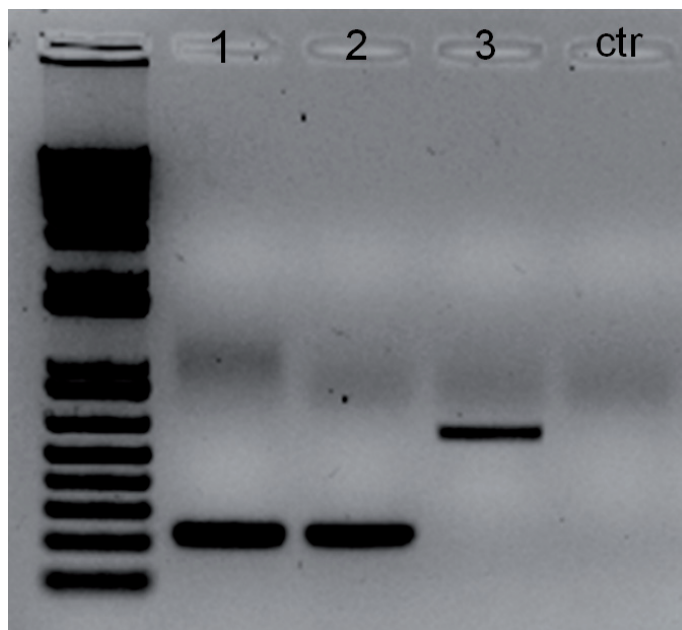


Figura 4. Gel de agarose em que foram aplicados os produtos da RT-PCR para avaliação da qualidade do cDNA sintetizado. (1) e (2) resultado da RT-PCR que teve como molde cDNA; (3) resultado da PCR que teve como molde DNA genômico; e (ctr) controle negativo da reação, sem molde. Não se observa em 1 e 2 a presença da banda de 570 pb, o que indica a ausência de contaminação com DNA genômico. O marcador utilizado foi o 1 kb Plus (Invitrogen).

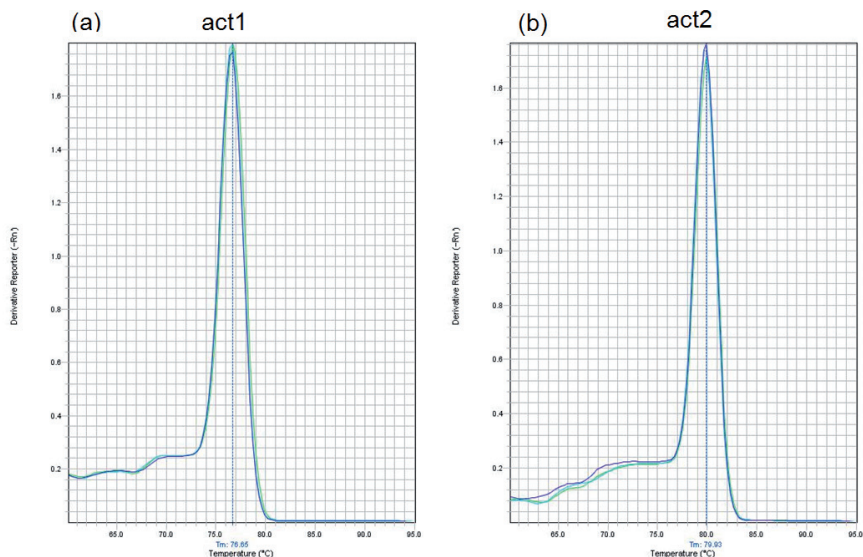


Figura 5. Curva de dissociação obtida da amplificação com o par de iniciadores (a) *act1* e (b) *act2*. Em azul estão destacadas as temperatura de dissociação (Tm).

Análise da expressão dos genes constitutivos selecionados

Após a otimização das reações de RT-qPCR, os níveis de expressão dos genes constitutivos *Act1* e *Act2* foram avaliados nos diferentes materiais e pontos de coleta. Foram comparados os valores de Ct em um limiar fixo, ou *threshold*, pré-determinado para todas as amostras. Valores das médias das repetições experimentais e seus respectivos desvios padrão foram plotados em gráficos. Na Figura 6 estão os resultados obtidos nos ensaios de estresse hídrico com *A. magna*. Pode-se observar que, tanto para as amostras de raízes como para as de folhas, não há diferenças significativas entre os valores de Ct de amostras que receberam o tratamento e as amostras do controle. Essa é uma evidência de que o tratamento não influenciou a expressão gênica dos dois genes analisados. Na Figura 7 estão os resultados obtidos nos ensaios com *A. stenosperma* e *A. hypogaea* infectadas pelo nematoide *M. arearia*. Observa-se novamente que não há diferenças

significativas entre os valores de Ct de plantas de *A. stenosperma* do grupo controle e infectadas, o que mostra que a expressão gênica dos genes *Act1* e *Act2* não foi alterada após a submissão das plantas ao estresse. Pode-se notar também que os valores de Ct de plantas de *A. hypogaea* infectadas pelo nematoide são próximos aos obtidos para *A. stenosperma*, o que evidencia que os níveis de expressão desses dois genes são similares nas duas espécies analisadas.

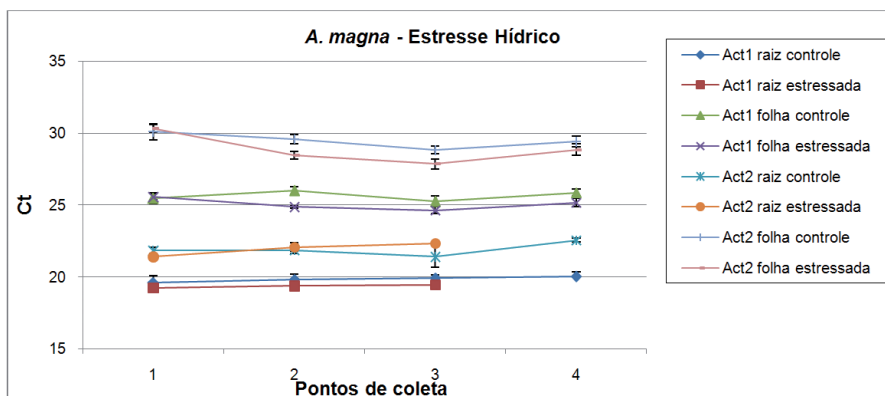


Figura 6 – Curva do Ct em função dos pontos de coleta para as amostras de *A. magna* submetidas ao estresse hídrico e seus respectivos controles. Os iniciadores que amplificam os genes *Act1* e *Act2* foram utilizados na reação. Os pontos de coleta correspondem a graus variados de estresse (pontos 1 e 2) e de reidratação após estresse (3 e 4). Ct - número de ciclos da qPCR em que a fluorescência atinge um limiar fixo pré-determinado.

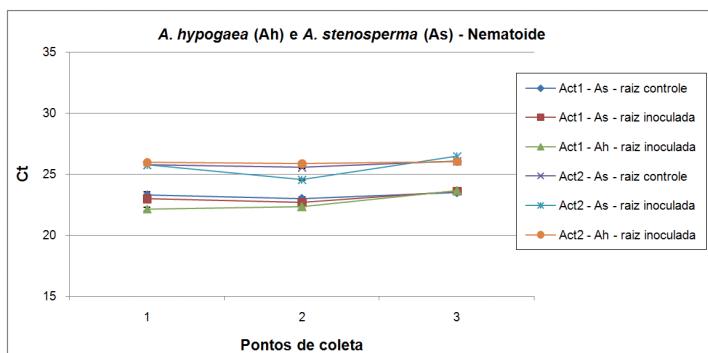


Figura 7 – Curva do Ct em função dos pontos de coleta para as amostras de *A. hypogaea* e *A. magnainoculadas* com *M. arenaria* e seus respectivos controles.

Conclusões

No presente trabalho, apresenta-se um protocolo simplificado e eficiente para análise de RT-qPCR de amostras de cDNA para três espécies de *Arachis*. O fato da reação de síntese de cDNA ser imediatamente precedida pela digestão do DNA genômico, que é contaminante nas extrações de RNA, torna este protocolo mais rápido e menos laborioso, pois não há necessidade de uma etapa adicional de purificação do RNA para a remoção da DNase e evita eventuais perdas do material causadas por este procedimento. A redução bem-sucedida do volume final das reações de RT-qPCR em $\frac{1}{5}$ do que é recomendado pelo fabricante torna este protocolo bastante econômico.

Neste trabalho, também foi reportada a estabilidade da expressão de dois genes que codificam actina em espécies do gênero *Arachis* submetidas a estresses biótico ou abiótico. *Act1* e *Act2* são bons candidatos a serem utilizados como genes de referência em ensaios futuros de RT-qPCR, pois não tiveram sua expressão influenciada pelos tratamentos a que as plantas foram submetidas.

Referências

BRASILEIRO, A.C.M.; SANTOS, C.M.R.; MORGANTE, C.V.; MARTINS, A.C.Q.; SILVA, F.R.; ARAÚJO, A.C.G.; BERTIOLI, D.J.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; GUIMARÃES, P.M. **Análise *in silico* da expressão gênica diferencial de plantas de *Arachis magna* submetidas a estresse hídrico**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. 22 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 229).

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M.K.; SCHEIBLE, W.R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 139, n. 1, p. 5-17, 2005.

GUTIERREZ, L.; MAURIAT, M.; PELLOUX, J.; BELLINI, C.; WUYTSWINKEL, O.V. Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. **Plant Cell**, v. 20, n. 7, p. 1734-1735, 2008.

HOUGAARD, B.K.; MADSEN, L.H.; SANDAL, N.; MORETZSOHN, M. C.; FREDSLUND, J.; SCHAUER, L.; NIELSEN, A.M.; ROHDE, T.; SATO, S.; TABATA, S.; BERTIOLI, D.J.; STOUGAARD, J. Legume anchor markers link syntenic regions between *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* and *Arachis*. **Genetics**, v. 179, n. 4, p. 2299-2312, 2008.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, v. 6, n. 4, p. 279-284, 2005.

ISKANDAR, H.M.; SIMPSON, R.S.; CASU, R.E.; BONNETT, G.D.; MACLEAN, D.J.; MANNERS, J.M. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, n. 1, p. 325-337, 2004.

JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A.K.; KHURANA, J.P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, n. 2, p. 646-651, 2006.

LIBAULT, M.; THIBIVILLIERS, S.; BILGIN, D. D.; RADWAN, O.; BENITEZ, M.; CLOUGH, S. J.; STACEY, G. Identification of Four Soybean Reference Genes for Gene Expression Normalization. **Plant Genome**, v. 1, n. 1, p. 44-54, 2008.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W.E.; ATTIYA, S.; BADER, J.S.; BEMBEN, L.A.; BERKA, J.; BRAVERMAN, M.S.; CHEN, Y.J.; CHEN, Z.; DEWELL, S.B.; DU, L.; FIERRO, J.M.; GOMES, X.V.; GODWIN, B.C.; HE, W.; HELGESEN, S.; HO, C.H.; IRZYK, G.P.; JANDO, S.C.; ALENQUER, M.L.; JARVIE, T.P.; JIRAGE, K.B.; KIM, J.B.; KNIGHT, J.R.; LANZA, J.R.; LEAMON, J.H.; LEFKOWITZ, S.M.; LEI, M.; LI, J.; LOHMAN, K.L.; LU, H.; MAKHIJANI, V.B.; MCDADE, K.E.; MCKENNA, M.P.; MYERS, E.W.; NICKERSON, E.; NOBILE, J.R.; PLANT, R.; PUC, B.P.; RONAN, M.T.; ROTH, G.T.; SARKIS, G.J.; SIMONS, J.F.; SIMPSON, J.W.; SRINIVASAN, M.; TARTARO, K.R.; TOMASZ, A.; VOGT, K.A.; VOLKMER, G.A.; WANG, S.H.; WANG, Y.; WEINER, M.P.; YU, P.; BEGLEY, R.F.; ROTHBERG, J.M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376-380, 2005.

PROITE, K. **Busca de genes envolvidos na resistência de amendoim silvestre ao nematóide das galhas (*Meloidogyne arenaria*)**. 2007. 213p. Tese (Doutorado), Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

PROITE, K.; LEAL-BERTIOLI, S.C.; BERTIOLI, D.J.; MORETZSOHN, M.C.; DA SILVA, F.R.; MARTINS, N.F.; GUIMARÃES, P.M. ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. **BMC Plant Biology**, v. 7, p.1-10, 2007.

ROBERSON, ROY. **Peanut biodiesel could save farmers millions**. Western Farm Press, 2007. Disponível em: <http://www.westernfarmpress.com/mag/farming_peanut_biodiesel_save/index.html>.

SILVEIRA, E.D.; ALVES-FERREIRA, M.; GUIMARÃES, L.A.; DA SILVA, F.R.; CARNEIRO, V.T.C. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiariabrizantha*. **BMC Plant Biology**, v. 9, p. 1-10, 2009.

UDVARDI, M.K.; CZECHOWSKI, T.; SCHEIBLE, W-R. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. **Plant Cell**, v. 20, n. 7, p. 1736–1737, 2008.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTSR.; LEUNISSEN, J.A.M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. W71-W74, 2007.

USDA. **Approved by the World Agricultural Outlook Board/USDA**. 2008. (Circular Series). Disponível em: <<http://www.usda.gov>>. Acesso em: 25 nov. 2009.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accuratenormalizationof real-time quantitative RT-PCR data bygeometricaveragingofmultipleinternalcontrol genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 1-12, 2002.

VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W.
Serial analysis of gene expression. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 484-487,
1995.



***Recursos Genéticos
e Biotecnologia***

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

