

## Expressão De Genes De Referência Para Uso Em Reações de qPCR Em Genótipos De Soja Contrastantes Para O Conteúdo De Ácido Oléico cultivados Sob Diferentes Temperaturas

Ana Paula Mendes Silva<sup>1</sup>, Marcos de Oliveira Pinto<sup>2</sup>, Maria Fernanda Antunes Cruz<sup>3</sup>, Carla Quinhones Godoy Soares<sup>4</sup>, José Baldin Pinheiro<sup>5</sup>, Maurílio Alves Moreira<sup>6</sup>, Everaldo Gonçalves de Barros<sup>7</sup>

### Resumo

Fatores ambientais, como a temperatura, podem provocar alterações no conteúdo de ácidos graxos em sementes de soja. Para maximizar o processo de obtenção de genótipos superiores é crucial o entendimento dos mecanismos de regulação que levam à alteração no conteúdo de ácidos graxos em função de diferentes temperaturas de cultivo. A análise da expressão gênica requer o uso de genes de referência que apresentam expressão constitutiva independente do genótipo e/ou condição de cultivo. Dessa forma, faz-se necessário o estudo da estabilidade de expressão dos genes de referência para posteriormente utilizá-los em experimentos de expressão gênica. O presente trabalho tem como objetivo selecionar genes de referência com expressão gênica constitutiva e estável em genótipos de soja contrastantes para conteúdo de ácido oleico, cultivados em diferentes temperaturas. Foram utilizados os genótipos: CD219, variedade comercial com concentrações normais de ácido oléico (~19%) e FA22, com elevada concentração de ácido oléico (~50%). O experimento foi conduzido em duas casas de vegetação: i) com aquecimento, com temperaturas médias na faixa de 32/27°C; ii) sem aquecimento, com temperaturas médias na faixa de 26/14°C. Foram avaliados quatro genes de referência: ACT11, UNK1, UNK2 e CONS7 quanto à eficiência de amplificação e a estabilidade da expressão, utilizando o programa *BestKeeper*. As eficiências de amplificação, que variaram de 90% (ACT11 e UNK2) a 94% (CONS7), validam o experimento e, consequentemente, permitem as análises de quantificação de transcrito utilizando o método  $2^{-\Delta Ct}$ . Nos grãos de peso intermediário os quatro genes de referência apresentaram elevado coeficiente de correlação ( $r > 0,90$ ) e desvio padrão menor que 2. Assim, esses genes apresentaram expressão constitutiva e estável na condição experimental avaliada permitindo a sua utilização nos cálculos de expressão gênica. Porém, nas sementes de peso final o gene CONS7 não se apresentou estável e dessa forma não é recomendada a utilização desses grãos de soja

### Introdução

O conteúdo de óleo e a composição de ácidos graxos nas sementes de soja são fortemente influenciados por fatores ambientais. Dentre eles, destaca-se a temperatura durante o desenvolvimento da semente. Em soja, tem sido observado que o aumento da temperatura resulta na redução dos conteúdos de ácido linoléico e linolênico, e num significativo aumento no conteúdo do ácido oléico (Bachlava & Cardinal 2009; Ren *et al.* 2009).

O estudo dos mecanismos de regulação das vias de biossíntese de ácidos graxos pode fornecer um maior entendimento de como os fatores genéticos, ambientais e a interação entre eles afetam essa via biossintética. A partir desse estudo, pode-se direcionar o processo de produção de genótipos superiores com conteúdos de ácidos graxos mais adequados para diversos fins na indústria alimentícia e de biodiesel.

A quantificação da expressão de genes de interesse pela técnica de PCR quantitativo requer a normalização dos dados com o nível de expressão gênica de genes de referência (Livak & Schmittgen 2001). Mais de 200 possíveis genes de referência em soja foram já identificados (Libault *et al.* 2008), entre os quais os genes ACT11, UNK1 e UNK2 se destacaram por serem estáveis na maioria das condições testadas. O gene

1 Mestranda do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas – Universidade de São Paulo (USP)/Piracicaba. Bolsista da CAPES. e-mail: anapmendes@usp.br

2 Analista da Embrapa Milho e Sorgo – CNPMS - EMBRAPA/Sete Lagoas. e-mail: marcos.deoliveira@embrapa.br

3 Doutora em Biologia Celular e Estrutural - Universidade Federal de Viçosa (UFV)/Viçosa. e-mail: mariafernandaantunesdacruz@gmail.com.

4 Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola – Universidade Federal de Viçosa (UFV)/Viçosa. Bolsista FAPEMIG, email: carla.quinhones@gmail.com

5 Professor Titular do Departamento de Genética da Universidade de São Paulo – USP/Piracicaba. e-mail: jbaladin@usp.br

6 Professor Titular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa – UFV/Viçosa. e-mail: moreira@ufv.br

7 Professor da Universidade Católica de Brasília - UCB/Brasília. e-mail: everaldodebarros@gmail.com

CONS7 descrito na literatura também apresenta alto potencial para ser utilizado como gene de referência (Hu *et al.* 2009). No entanto, esses estudos carecem de conclusões a respeito da estabilidade de expressão em genótipos de soja submetidos a diferentes temperaturas de cultivo.

O Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja (PMQS) do BIOAGRO/UFV dispõe de diferentes linhagens mutantes de soja com alterações na composição de ácidos graxos da semente. Entre eles destaca-se a linhagem FA22, que possui teor médio a elevado de ácido oléico, em torno de 50%. Assim, para maximizar o processo de obtenção de genótipos superiores é crucial o entendimento do efeito da temperatura na composição de ácidos graxos nesses genótipos, assim como o entendimento dos possíveis meios de regulação da via de biossíntese desses compostos. Para isso faz-se necessário o estudo da estabilidade de expressão dos genes de referência para posteriormente utilizá-los em experimentos de expressão gênica via PCR quantitativo. O presente trabalho teve como objetivo selecionar genes de referência com expressões constitutiva e estável em genótipos de soja contrastantes para o conteúdo de ácido oléico, cultivados em diferentes temperaturas.

### Material e Métodos

**Material genético** - Foram utilizados dois genótipos de soja: FA22 e CD219RR. O genótipo FA22 foi selecionado em uma população de melhoramento com reduzido ácido linoléico e possui elevado conteúdo de ácido oléico, aproximadamente 50%. A variedade CD219RR (OC94.2062 x CO 2131RR) foi desenvolvida pela empresa COODETEC (Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola), possui teor normal de ácido oléico (~19 %), além de apresentar resistência ao herbicida glifosato.

**Condições de cultivo** - As plantas foram cultivadas em casa de vegetação do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no período de maio a agosto de 2010. O experimento foi conduzido em duas casas de vegetação: i) com aquecimento, que permitiu a obtenção de temperaturas médias diurnas de 32°C e noturnas de 27°C; ii) sem aquecimento, com temperaturas médias diurnas de 26°C e noturnas de 14°C. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 50 vasos por genótipo. As sementes foram plantadas em vasos de três litros contendo solo previamente adubado, cultivando-se três plantas por vaso. As sementes em desenvolvimento de cada genótipo foram coletadas e congeladas separadamente em nitrogênio líquido, de acordo com o seu peso úmido. Foram selecionadas sementes em duas faixas de peso: i) 226 a 275mg para compor as sementes de peso intermediário, e ii) 376 a 425mg para compor as semente de peso final de enchimento do grão.

**Extração e purificação de RNA** - A extração de RNA total de sementes de soja foi realizada com o reagente Trizol® (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. As extrações foram realizadas em amostras de 100 mg, constituindo de três extrações individuais e independentes. Para compor cada amostra foram tomadas ao acaso 9 sementes de cada estágio de desenvolvimento/genótipo. O RNA total foi tratado com DNase RNase Free (Promega) seguindo as recomendações do fabricante.

**Síntese de cDNA** - A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 1 µg do RNA total, utilizando a M-MLV Reverse Transcriptase (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

**Análise da estabilidade da expressão dos genes de referência** - A análise dos níveis de transcritos foi realizada utilizando-se a metodologia de PCR quantitativo. *Primers* específicos foram desenhados a partir das sequências de nucleotídeos dos cDNAs completos correspondentes dos genes endógenos (ACT11, UNK1, UNK2 e CONS7) previamente descritos na literatura (Libault *et al.* 2008; Hu *et al.* 2009) (Tabela 1).

Tabela 1: Conjunto de *primers* utilizados no experimento de qPCR

Gene	Primer F	Primer R
ACT11	ATCTTGACTGAGCGTGGTTATTCC	GCTGGTCCTGGCTGTCTCC
UNK1	TGGTGCTGCCGCTATTTACTG	GGTGAAGGAAGCTGCTAACATC
UNK2	GCCTCTGGATACCTGCTCAAG	ACCTCCTCCTCAAACCTCCTCTG
CONS7	ATGAATGACGGTTCCCATGTA	GCATTAAGGCAGCTCACTCT

As reações de qPCR foram realizadas utilizando o termociclador SDS ABI PRISM® 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As amostras foram analisadas em duplicata técnica, em reações de 20

µL contendo 50ng de cDNA, 10,0 µL de 2X SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) e *primers* nas concentrações de 400 nM. As condições de amplificação foram: uma etapa a 50°C por 2 min, seguida de uma etapa de 95°C por 10 min e 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 s e anelamento e extensão a 60°C durante 30 s. A curva de dissociação foi realizada após a amplificação para verificar se apenas um único amplicon era gerado em cada reação.

A eficiência de amplificação de cada um dos *primers* foi calculada plotando-se graficamente os valores obtidos de Ct no eixo das ordenadas e o logaritmo dos valores de cada diluição no eixo das abscissas. O valor do coeficiente angular (s) da reta foi utilizado para o cálculo da eficiência, a partir da fórmula: Eficiência PCR =  $(10^{(1/s)} - 1) \times 100$ . Coeficiente angular com valor de -3,32 indica que a reação de PCR apresenta 100% de eficiência (Ginzinger 2002).

A estabilidade da expressão dos genes endógenos (ACT11, UNK1, UNK2 e CONS 7), nos genótipos FA22 e CD219, nas duas condições de cultivo, foi determinada por meio do programa estatístico *BestKeeper* (Pfaffl *et al.* 2004). O programa utiliza os dados de eficiência de amplificação e a média do *Cycle Threshold* (Ct) dos genes analisados em todas as condições testadas para realizar o cálculo do coeficiente de variação do número Ct (CV [% Ct]) e do desvio padrão das médias do número Ct, fornecendo parâmetros para estimar a estabilidade de expressão dos genes analisados. Além disso, o programa cria um coeficiente de correlação (r) entre cada gene analisado e a média geométrica do valor de Ct de todos os genes de referência candidatos juntos.

## Resultados e Discussão

Para os quatro genes de referência avaliados, foram verificadas altas eficiências de amplificação (Tabela 2), variando de 90% (ACT11 e UNK2) a 94% (CONS7), validando os pares de primers desenhados e consequentemente permitindo as análises de quantificação de transcritos pelo o método  $2^{-\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen 2001).

Tabela 2: Cálculo da eficiência de amplificação dos pares de *primers* dos genes de referência

Gene	Coeficiente angular	r*	Eficiência (%)
ACT11	-3,597	0,995	90%
UNK1	-3,14	0,978	92%
UNK2	-3,102	0,999	90%
CONS7	-3,474	0,998	94%

\* r coeficiente de correlação da curva de eficiência.

Os parâmetros estatísticos para a investigação da estabilidade da expressão dos quatro genes de referência (ACT11, UNK1, UNK2 e CONS7) são apresentados nas Tabelas 3 e 4. O coeficiente de correlação (r) e o desvio padrão são os principais parâmetros para avaliar a estabilidade de expressão dos genes de referência. Espera-se que genes estáveis apresentem elevado coeficiente de correlação (r) e baixo o desvio padrão (Pfaffl *et al.* 2004).

Tabela 3: Dados estatísticos gerados pelo programa *Bestkeeper* para os quatro genes de referência avaliados nos estádios intermediários de desenvolvimento da semente de soja

Parâmetro estatístico	ACT11	UNK1	UNK2	CONS7
Média geométrica [dos CTs]	21,29	26,04	28,11	24,36
Desvio Padrão [ $\pm$ CT]	0,81	0,35	0,52	0,67
Coeficiente de variação [% CT]*	3,79	1,34	1,86	2,75
Desvio padrão [ $\pm$ x-fold]**	1,68	1,25	1,40	1,59
Coeficiente de correlação [r]	0,991	0,926	0,984	0,984
<i>p-value</i>	0,001	0,001	0,001	0,001

\* Coeficiente de variação, expresso como porcentagem do número do Ct.

\*\* Desvio padrão dos coeficientes absolutos.

Tabela 4: Dados estatísticos gerados pelo programa *Bestkeeper* para os quatro genes de referência avaliados nos estádios finais de desenvolvimento da semente de soja

Parâmetro estatístico	ACT11	UNK1	UNK2	CONS7
Média geométrica [dos CTs]	21,95	24,71	27,98	25,52
Desvio Padrão [± CT]	0,79	0,70	0,60	0,63
Coefficiente de variação [% CT]*	3,63	2,84	2,14	2,45
Desvio padrão [± x-fold]**	1,74	1,62	1,51	1,54
Coefficiente de correlação [r]	0,921	0,970	0,901	0,761
<i>p-value</i>	0,001	0,001	0,001	0,004

\* Coeficiente de variação, expresso como porcentagem do número do Ct.

\*\* Desvio padrão dos coeficientes absolutos.

Conforme mostrado na Tabela 3, todos os genes de referência testados com os grãos de peso intermediário apresentaram elevado coeficiente de correlação ( $r > 0,90$ ) e desvio padrão menor que 2. Assim, a partir desses parâmetros, para grãos na faixa intermediária de peso úmido, os quatro genes de referência avaliados apresentaram expressão estável nos genótipos CD219 e FA22 submetidos a diferentes temperaturas de cultivo.

No entanto, nos grãos de peso final, o gene CONS7 apresentou o coeficiente de correlação de 0,761, relativamente baixo se comparado aos demais genes de referência (ACT11, UNK1 e UNK2), o que evidencia que esse gene sofre variação em função do genótipo e/ou da temperatura de cultivo. Dessa forma, não é indicada a sua utilização como gene de referência nas análises dos experimentos de expressão gênica em grãos com essa faixa de peso úmido.

### Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo suporte financeiro e concessão da bolsa de estudo de doutorado.

### Referências

- Bachlava E and Cardinal AJ (2009) Correlation between Temperature and Oleic Acid Seed Content in Three Segregating Soybean Populations. **Crop Science** **49**: 1328–1335.
- Ginzinger D (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology** **30**: 503–512.
- Hu R; Fan C, Li H, Zhang Q and Fu YF (2009) Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC Molecular Biology** **93**: 1-12.
- Libault M, Thibivilliers S, Bilgin DD, Radwan O, Benitez M, Clough SJ and Stacey G (2008) Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. **The plant genome** **1**: 44-54.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Methods** **25**: 402-408.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C and Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pairwise correlations. **Biotechnology Letters** **26**: 509-515.
- Ren C, Bilyeu KD and Bauselinck PR (2009) Composition, vigor, and proteome of mature soybean seeds developed under high temperature. **Crop Science** **49**: 1010-1022.