

Otimização de *primers* de genes de referência para estudos de expressão gênica em bananeira

Taís Araújo Santos¹; Julianna Matos da Silva²; Amanda Gabrielly Santana Silva³;
Rogério Mercês Ferreira Santos⁴, Andresa Priscila de Souza Ramos⁵; Edson Perito Amorim⁶, Claudia Fortes
Ferreira⁷

^{1,3}Estudante de Bacharelado em Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, bolsista FAPESB, tai.19@hotmail.com, manda.gaby@hotmail.com; ²Doutoranda em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, juliannamatos91@gmail.com; ⁴Professor da Universidade Estadual de Feira de Santana, rmfsantos@uefs.br; ⁵Analista da Embrapa Mandioca e Fruticultura, andresa.ramos@embrapa.br; ⁶Pesquisador(a) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, edson.amorim@embrapa.br, claudia.ferreira@embrapa.br.

Uma das ferramentas que auxiliam o desenvolvimento de bananeiras resistentes/tolerantes aos principais fatores bióticos e abióticos, é a análise da expressão de genes candidatos em PCR em tempo real (RT-qPCR). Entretanto, para a validação desses genes, é necessário também, que seja otimizado genes normalizadores da reação, denominados também de genes de referência ou endógenos. A análise precisa dos resultados gerados pela qRT-PCR está diretamente relacionada ao gene normalizador utilizado, o qual deve apresentar expressão constitutiva semelhante para as diferentes amostras/tratamentos avaliados no experimento. Existem diversos genes que podem ser utilizados como normalizadores nas análises de qPCR, entretanto, nem todos apresentam a mesma eficiência de reação e normalização para diferentes culturas, estádios fisiológicos e partes da planta. A avaliação da amplificação de primers referentes aos genes endógenos em gel de agarose, antes do seu uso no equipamento de PCR em tempo real, é fundamental para economia de tempo, mão de obra e o custo com os reagentes. Portanto, o principal objetivo do trabalho foi testar e otimizar via PCR convencional genes normalizadores úteis ao estudo de expressão gênica em bananeira (*Musa* spp.). Um total de oito primers endógenos mais utilizados para a cultura foram selecionados da literatura. Para a otimização dos primers para os genes de referência, foram coletadas amostras de tecido foliar jovem de quatro genótipos de bananeira pertencentes ao BAG-Banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Após a coleta, procedeu-se à extração do RNA utilizando protocolo CTAB modificado. A avaliação da qualidade e quantidade do RNA foi realizada em gel de agarose 0.8 %, corado com brometo de etídio. O RNA foi tratado com o kit DNA Turbo-free (Ambion) para degradação do DNA e em seguida procedeu-se à etapa de síntese de cDNA, utilizando-se o kit síntese de cDNA primeira fita (High Capacity RNA-to-cDNA kit - Applied Biosystems). Foram testadas diferentes temperaturas de anelamento em oito primers endógenos via PCR convencional e os fragmentos visualizadas em gel de agarose 2%. A partir destes dados, foram identificadas as melhores temperaturas de anelamento para cada um dos genes endogenos candidatos. As melhores temperaturas de anelamento encontradas para os genes de referência em estudo foram: Actina 51°C, Tubulin 51°C, Ubiquitin-conjugating enzyme E2 6 (Ubc6) 53°C, Transcription initiation factor TFIID subunit 10 (Taf10) 55°C, 25S rRNA (25SMU) 59°C, Fator de alongação (EF1MU) 62°C, Ribonucleoproteína (L2MU) 61°C e Actina11 (Act11MU) 60°C. Conclui-se que essas temperaturas podem ser consideradas ajustadas para os primers de referência e poderão ser usadas na validação de genes candidatos em estudos de expressão gênica em bananeira.

Significado e impacto do trabalho: Este trabalho servirá de base para estudos de expressão gênica e validação de genes candidatos para tolerância aos principais fatores bióticos e abióticos em bananeira, contribuindo com informações para o melhoramento genético da cultura no desenvolvimento de variedades.