

Identificação de Genes Referência em *Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf para Estudo de Expressão Gênica Usando qRT-PCR¹

Erica Duarte Silveira¹, Larissa Arrais Guimarães², Márcio Alves-Ferreira³ e Vera Tavares de Campos Carneiro⁴

Introdução

Brachiaria é um gênero de gramíneas nativas da África tropical e compreende aproximadamente 100 espécies [1]. É o mais importante gênero da família *Poaceae* no Brasil, no que concerne a produção de forragem para gado. Em *Brachiaria*, o modo de reprodução apomítico é predominante em grande parte das espécies já estudadas [2] e as cultivares apomíticas *B. brizantha* cv. Marandu e *B. decumbens* cv. Basilisk são as mais utilizadas como pastagem, devido às suas características agrônômicas [3]. A ocorrência dos dois modos de reprodução, apomítico e sexual, em acessos de espécies de *Brachiaria*, como em *B. brizantha* e *B. decumbens*, tornam essas espécies modelos para o estudo molecular do modo de reprodução apomítico.

Tecnologias de análise de expressão gênica diferencial são muito importantes em estudos de comparação de processos biológicos. Uma tecnologia bastante aplicada é a reação de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR), técnica que permite uma análise acurada da expressão de genes em diferentes tecidos. Para utilização de qRT-PCR e cálculo da expressão relativa de um determinado gene em diferentes tecidos, faz-se necessária a identificação de genes referência, ou seja, genes que apresentem um padrão de expressão estável em diferentes tecidos que possam ser utilizados para normalização dos dados. A utilização de genes referência sem prévia verificação da sua estabilidade pode levar a má interpretação dos dados de expressão relativa e, com isso, gerar resultados que não representam as condições *in vivo*. Para *Brachiaria*, ainda não foram descritos genes referência para qRT-PCR. Com o intuito de identificar os melhores genes referência para análise de expressão diferencial de genes durante o desenvolvimento do gameta feminino em *B. brizantha* apomítica e sexual, foram desenhados iniciadores para nove EST's, oriundos de uma biblioteca de cDNA de ovário de *B. brizantha*, que possuíam similaridade com seqüências de outras

espécies que já foram utilizadas como genes referência [4, 5] e esses iniciadores foram testados em reações de qRT-PCR utilizando como material vegetal diferentes tecidos de plantas sexuais e apomíticas de *Brachiaria brizantha*.

Material e métodos

Material Vegetal

Brachiaria brizantha cv. Marandu, acesso BRA 000591 apomítica (B030) e *Brachiaria brizantha* sexual, acesso BRA 002747 (B105), fornecidas pela Embrapa Gado de Corte – MS e mantidas em campo na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Foram testadas 20 amostras para a extração de RNA total: ovário e antera nos estágios I, II, III e IV de desenvolvimento, espiguetas, folha e raiz de B030 e B105.

Preparo de amostra para q RT-PCR

A extração do RNA total de folha e raiz foi feita utilizando o kit RNeasy RNA extraction kit (QIAGENTM) e o método de extração por Trizol (GibcoTM) foi utilizado para extração de RNA total de espiguetas, ovário e antera. O RNA foi então tratado com DNase (AmershamTM) e purificado em coluna RNeasy Mini Column (Qiagen). Para cada amostra foram feitas duas extrações independentes. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2% e a quantidade no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop TechnologiesTM). Somente as amostras de RNA com razão A₂₆₀/ A₂₈₀ entre 1,9 e 2,1 foram utilizadas para síntese da fita simples de cDNA. Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa de 2 µg de RNA, no mínimo, em volume final de 20 µL utilizando a enzima Superscript II (InvitrogenTM).

1. Erica Duarte Silveira é doutoranda em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ,. E-mail: ericads@cenargen.embrapa.br. Bolsista da CAPES.

2. Larissa Arrais Guimarães é mestranda do Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF. E-mail: larissaarrais@yahoo.com.br. Bolsista do CNPq.

3. Márcio Alves-Ferreira é Professor Titular do Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Genética Molecular Vegetal, Rio de Janeiro, RJ. E-mail: alvesfer@biologia.ufrj.br

4. Vera Tavares de Campos Carneiro é pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Laboratório de Reprodução Vegetal, Brasília, DF E-mail: vera@cenargen.embrapa.br

Apoio financeiro: CAPES, CBAB MCT-CNPq e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Desenho de iniciadores

Para identificação dos genes referência em *B. brizantha* foram desenhados iniciadores para nove genes ortólogos àqueles já descritos na literatura como referência para outras espécies de plantas [4, 5]. A descrição dos genes escolhidos, assim como a origem da sequência, estão descritas na Tabela 1.

Reação de qRT-PCR

A reação de qRT-PCR foi feita em um volume final de 20 μ L, utilizando 1/15V de cDNA fita simples (6,7 ng RNA total). Para cada reação foi utilizado Tampão PCR (InvitrogenTM) 1X concentrado, $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTP's 0,1 mM, 0,25 U Taq Platinum (InvitrogenTM), SYBR Green (AmershamTM) 0,1X Concentrado, 0,2 μ M de cada iniciador. As reações foram feitas sob as seguintes condições, usando Chromo 4 Real Time PCR Detector (BioRadTM): 5 minutos a 94 °C; 40 ciclos de: 15 segundos a 94°C, 10 segundos a 60°C, 15 segundos a 72°C, 35 segundos a 60°C. Para verificar a especificidade de amplificação dos genes foi feita uma curva de dissociação após a reação, de 30°C a 100°C, com leitura a cada 1°C. Além disso, o perfil dos produtos amplificados foi analisado por eletroforese em gel de agarose. Os dados gerados a partir do software Opticon 3, utilizado para leitura de fluorescência, foram colocados em planilha MS Excel (Microsoft, Redmond, WA), e analisados nos aplicativos visual basic do MS Excel qBase versão 1.3.4 (<http://medgen.ugent.be/qbase/>), e GeNORM versão 3.4, (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>).

Para identificação dos genes mais estáveis dentro dos tecidos escolhidos, foi utilizado o programa GeNORM, que calcula um valor de estabilidade M. O cálculo de M é baseado na média da variação (*pairwise variation*) entre um gene particular e todos os outros genes analisados. Por exclusão dos genes menos estáveis, maior valor M, são identificados os genes mais estáveis. Como resultado, é gerado um fator de normalização (NF) e a partir desse valor NF, determina-se o número ideal de genes referência a ser utilizado para uma normalização acurada dos níveis de expressão dos genes a serem estudados. Esse número ideal é dado pela inclusão de genes controles (n+1) no cálculo de NF até que não haja contribuição significativa desses genes adicionados para a

normalização ($V2/3$).

Resultados e Discussão

Com base na curva de dissociação (Figura 1) e análise em gel de agarose foi verificada a amplificação de um produto único para os nove genes e as quantificações absolutas geradas pelo Opticon 3 foram utilizadas para o cálculo de estabilidade dos genes.

Dos nove genes utilizados na análise, dois apresentaram um valor M desejado, considerando o valor já descrito em outras espécies [5, 6]. Foram eles: UBIE2, E UBCE, com valor M de 0,47 (Figura 2). Em relação ao número ideal de genes referência para análise, determinado a partir da variação entre pares (Figura 3), houve um aumento da instabilidade quando incluídos os genes SUCOA (V5/6) e TUB (V8/9). Por haver uma variação relativamente pequena entre os valores de $V2/3$ a $V4/5$, serão utilizados para análise de expressão relativa em *B. brizantha* os dois genes que apresentaram menos variação na sua expressão entre os tecidos testados, são eles: UBCE e UBIE2.

Referências

- [1] RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. 1996. Morphology, taxonomy and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: J. W. Miles, B. L. Maass, et al. (Ed). *Brachiaria: Biology, agronomy and improvement*. Cali, Colombia, Campo Grande-Brasil: CIAT-EMBRAPA.
- [2] VALLE, C.B. do; SAVIDAN, Y.H. 1996. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In Miles J W, Maass B L, Valle C B do (eds) *Brachiaria: Biology, agronomy and improvement*. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, Cali, Colombia pp 167-177.
- [3] FISHER, M. J.; KERRIDGE, P. C. 1996. The agronomy and physiology of *Brachiaria* species. In: J. W. Miles, B. L. Mass et al. (ed.). *Brachiaria: biology, agronomy and improvement*. Cali-Colombia, Campo Grande-Brasil: CIAT-Embrapa, v.1. The agronomy and physiology of *Brachiaria* species, 288p.
- [4] CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDE, M. K.; SCHEIBLE, W. R. 2005. Genome wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 139, p. 5-17.
- [5] JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. 2006. 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, p. 646-651.
- [6] GOOSSENS, K.; VAN POUCKE, M.; VAN SOOM, A.; VANDESOMPELE, J.; VAN ZEVEREN, A.; PEELMAN, L. J. 2005. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. *BMC Dev Biol.*; v.5, p.27.

Tabela 1. Descrição dos EST's escolhidos para escolha de genes referência de *B. brizantha* para qRT-PCR

GENE	ORIGEM	DESCRIÇÃO
TUB	B030	Alfa Tubulina
UBIBRA	B030	Ubiquitina
UBIE2BRA	B030	Ubiquitina
EIFBRA	B105	Fator De Iniciação Eucariótico
EIF4ABRA	B030	Fator De Iniciação Eucariótico 4a
GAPDHBRA	B105	Glicose 6 Fosfato Desidrogenase
GDPBRA	B030	Glicose Desidrogenase
SUCOABRA	B030	Succinil Coa Ligase
UBCEBRA	B030	Enzima De Conjugação A Ubiquitina

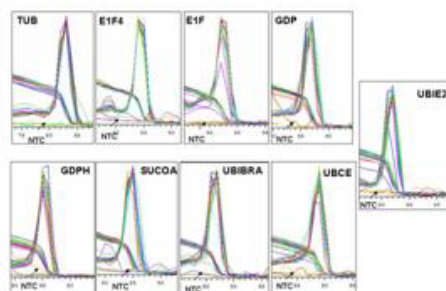


Figura 1. Especificidade de amplificação da reação de qRT-PCR, evidenciada pela curva de dissociação dos 9 genes. Presença de pico único para as 3 replicatas técnicas de cDNA dos 6 diferentes tecidos de *B. brizantha* e ausência de pico nos controles sem cDNA (seta).

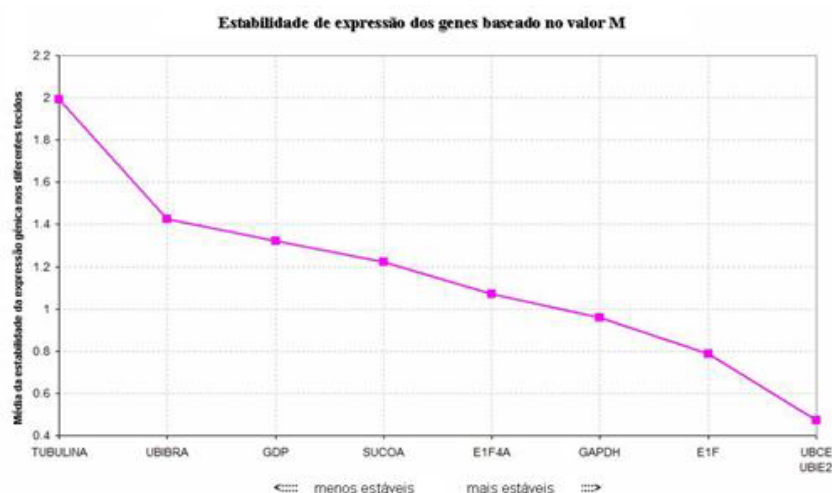


Figura 2. Estabilidade de expressão dos genes, baseado no valor M, calculado pelo GeNORM. Menor valor M indica maior estabilidade nos tecidos testados (raiz, folha, flor, ovário e antera de *B. brizantha* apomítica e sexual).

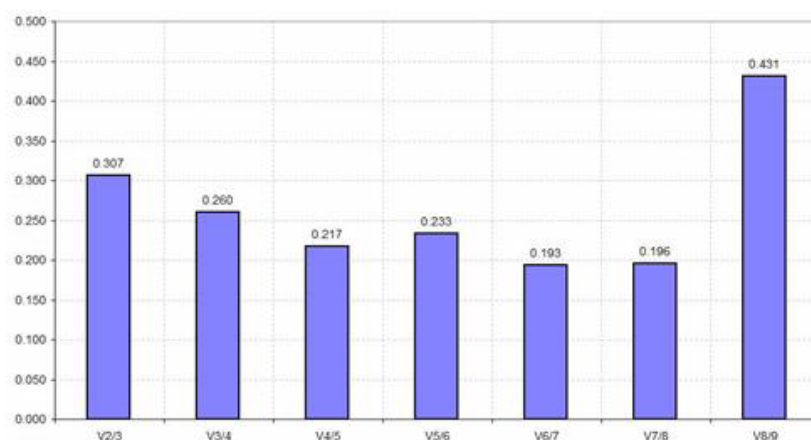


Figura 3. Histograma utilizado para determinação de um número ideal de genes referência para reação de qRT-PCR, baseado na variação (*pairwise variation*) entre NFn e NFn+1.