

Seleção de genes-referência para estudos de expressão gênica utilizando PCR quantitativa em macieiras

Perini, P¹; Pasquali, G²; Margis-Pinheiro, M³; Revers, LF⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS

²Laboratório de Biologia Molecular Vegetal, Centro de Biotecnologia, UFRGS

³Núcleo de Genômica Funcional de Plantas, Departamento Genética, UFRGS

⁴Laboratório de Genética Molecular Vegetal, EMBRAPA Uva e Vinho

pamela.perini@cnpv.embrapa.br

Palavras-chave: pomicultura, *Malus* spp., genes referência, RT-qPCR, expressão gênica

A macieira (*Malus x domestica*) é uma das mais importantes frutíferas do mundo, e sua produção tem destaque na região sul do Brasil. As pesquisas para o melhoramento genético de suas cultivares abrangem resistência a doenças, enxertia, exigência de frio, sabor e compostos nutracêuticos do fruto. Comparações entre padrões de expressão gênica de diferentes cultivares selvagens, comerciais e em desenvolvimento constituem ferramenta de alto valor científico para o melhoramento genético das macieiras. A técnica de PCR quantitativa precedida de transcrição reversa (RT-qPCR) oferece um recurso robusto para quantificar, de forma precisa, alterações na expressão de genes, sendo específica e sensível para mRNAs pouco abundantes. Contudo, a acurácia na avaliação é dependente de genes de referência estáveis para a normalização dos dados, validados antecipadamente à análise das amostras. A escolha de controles inapropriados pode resultar no desvio dos perfis de expressão gênica, declarações de significâncias estatísticas indevidas e caracterizações ou conclusões incorretas. Pelo presente trabalho, têm-se o objetivo de selecionar os melhores genes a serem usados como referências para estudos de expressão gênica via RT-qPCR em macieiras. Foram avaliados tecidos vegetativos e reprodutivos da cultivar Gala, amostrados durante o ciclo sazonal de crescimento e dormência da macieira. Com base na literatura e nas sequências anotadas para *Malus x domestica*, *primers* para os seguintes genes sugeridos como constitutivos foram projetados: *ACT2*, *ACT11*, *ACTfam* (família gênica), *EF1 α* , *EF1 β* , *GAPDH*, *MDH*, *PP2A-1*, *PP2A-A3*, *SAND*, *TUB α 5*, *TUB β 6* e *UBC10*. Os ensaios de RT-qPCR foram realizados no *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). A estabilidade dos genes foi determinada por diferentes descritores estatísticos, dentre eles *geNorm* e *NormFinder*. Como principais resultados e conclusões, todas as combinações de *primers* testadas permitiram ampliações específicas. Foram calculadas as eficiências para todas as reações. Inferências preliminares a partir da avaliação via *geNorm* indicaram os genes *ACT2*, *MDH*, *PP2A-A3* e *SAND* como os principais candidatos a genes normalizadores em diferentes tecidos de macieira.

Apoio financeiro: CAPES, FINEP, EMBRAPA