

## Caracterização de Genes de Referência com Amplo Espectro de Uso em Feijoeiro Comum para Validação de Dados de Expressão Gênica

Wendell Jacinto Pereira<sup>1</sup>, Priscila Zaczuk Bassinello<sup>2</sup>, Rosana Pereira Vianello<sup>3</sup>

### Resumo

Uma etapa fundamental da análise de resultados de sequenciamento de transcriptoma consiste na validação dos dados de expressão gênica que vem sendo conduzida com sucesso por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Esse trabalho foi realizado com o objetivo investigar e identificar através de RT-qPCR genes potencialmente constitutivos em feijoeiro comum com estabilidade de expressão em diferentes tecidos vegetais submetidos a condições ambientais adversas em genótipos provenientes de diferentes centros de domesticação. Dos 18 genes de referência avaliados, cinco apresentaram padrão de amplificação satisfatório, sem a formação de dímeros, porém diferenciados quanto à estabilidade de expressão nos tecidos e genótipos amostrados. Os genes selecionados servirão como normalizadores em experimentos de RT-qPCR subsequentes visando à validação de genes candidatos gerados a partir de projetos de pesquisa que contemplam ações de RNA-seq.

### Introdução

Com o estabelecimento de projetos de sequenciamento de regiões expressas do genoma da espécie *Phaseolus vulgaris* (feijoeiro comum) uma grande quantidade de informação de sequências transcritas de DNA tem sido gerada e depositada em banco de dados públicos e privados. A grande importância que esse legume de grão representa perante o consumo per capita brasileiro (182,9 g/dia, SALVADOR et al. 2011) e impacto para o desenvolvimento social e econômico social mundial tem propiciado o desenvolvimento de grandes projetos científicos. Nesse sentido, pesquisas aplicadas à prospecção de genes expressos na presença de estresses bióticos e abióticos, em diferentes genótipos, tecidos e estádios de desenvolvimento da planta têm sido estratégicas em todo mundo no que diz respeito a programas de melhoramento genético do feijoeiro comum (BLAIR et al. 2011).

A técnica de qRT-PCR tem como base o processo da transcrição reversa, no qual se produz a molécula de cDNA a partir do RNA, seguido da PCR onde em cada ciclo de amplificação os produtos formados são detectados em tempo real (HEID et al., 1996). Essa técnica, que se caracteriza por apresentar bastante sensibilidade e estabilidade em relação à detecção dos transcritos alvos, necessita da normalização dos dados gerados para se obter uma correta interpretação dos resultados obtidos (HUGGETT et al., 2005). Para a realização da normalização são necessários genes que apresentem um perfil de expressão estável no tecido que está sendo submetido à análise dentro e entre genótipos, assim como em condições ambientais diferentes. Alguns genes de referência são bastante conhecidos e bem estabelecidos quando ao uso na validação da expressão de genes (CZECHOWSKI et al. 2005). Para o feijoeiro comum apenas alguns genes foram avaliados e validados como genes estáveis em condições de estresse biótico e abiótico (BORGES et al, 2012).

O presente estudo teve como objetivo investigar e identificar através de RT-qPCR genes potencialmente constitutivos em feijoeiro comum com estabilidade de expressão em diferentes tecidos vegetais submetidos a condições ambientais adversas em genótipos provenientes de diferentes centros de domesticação.

### Material e Métodos

Amostras de RNA foram preparadas a partir seis grupos de experimentos em andamento no laboratório de Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão que incluíram as seguintes condições: 1) tecido foliar das variedades Pérola e BAT 477 na ausência e presença de déficit hídrico, 2) tecido radicular das variedades Pérola e BAT 477 na ausência e presença de déficit hídrico, 3) tecido foliar das variedades Realce e Executivo na ausência

---

<sup>1</sup> Aluno do Bacharelado em Biotecnologia – UFG/Goânia. Bolsista de iniciação científica na Embrapa Arroz e Feijão. e-mail: wendell.j.p@hotmail.com

<sup>2</sup> Pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão– CNPAF/Santo Antônio de Goiás. e-mail: prizac@gmail.com

<sup>3</sup> Pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão– CNPAF/Santo Antônio de Goiás. e-mail: rosanapv@ymail.com

e presença de estresse biótico, nos quais foram avaliados diferentes tempos a partir da inoculação com o patógeno *Colletotrichum lindemuthianum* (24h, 3 e 7 dias), 4) sementes das variedades Pérola, Madrepérola e Pontal, 5) tecido foliar das variedades AND 277, Executivo, Radiante e WAF 75 derivadas do pool gênico Andino, 6) tecido vegetal obtido das vagens das variedades Pérola e BAT 477.

A extração de RNA a partir dos tecidos foliar, radicular e de vagem foi realizada utilizando produto comercial baseado em coluna de purificação, e a extração das sementes utilizando o reagente de lise *Pury Link Plant RNA Reagent™* (Invitrogen), com adaptações (Pereira et al, em elaboração).

A quantificação das amostras de RNA, bem como a determinação do grau de pureza das mesmas foram estimados por meio de leitura baseada em equipamento de espectrofotometria *NanoVue™* (GE), seguido pela análise da integridade das amostras de RNA por meio da análise em equipamento *Agilent 2100 Bioanalyser* (GE). A síntese do cDNA foi conduzida utilizando o produto comercial *SuperScript® II Reverse Transcriptase* (Invitrogen™).

Foram escolhidos 18 genes constitutivos utilizados em experimentos com plantas para avaliação quanto a sua estabilidade de expressão nas amostras selecionadas, dos quais 16 encontram-se descritos na literatura (Tabela 1) e dois foram identificados a partir de seqüências do genoma de feijoeiro comum (Pv EEF1a e Pv 40S). Para a determinação da concentração de iniciadores mais eficiente e sem a formação de dímeros de primers promoveu-se a titulação de primer utilizando 9 diferentes combinações entre o *Forward* e o *Reverse*. Os genes cujas condições de amplificação foram ajustadas foram utilizados para amplificar as amostras por RT-qPCR. Tanto a titulação de primers, como a amplificação, foram realizadas utilizando o produto comercial *RealMasterMix SYBR ROX* (5Prime).

**Tabela 1.** Genes de referência utilizados para avaliação quanto à estabilidade da expressão previamente descritos na literatura em estudos com plantas.

Gene Candidato	Nº de acesso	Referência bibliográfica
18S rRNA	AK059783 <sup>a</sup>	(JAIN et al., 2006)
28S rRNA	AK119809 <sup>a</sup>	(JAIN et al., 2006)
Actin 11	AK100267 <sup>a</sup>	(ZHANG et al., 2009)
Actin 16280	****	(ZHANG et al., 2009)
β-Tubulin	CV530631 <sup>b</sup>	(ETICHA et al., 2010)
Cons 6-3	CD397253 <sup>b</sup>	(LIBAULT et al., 2008)
Cons 7	AW310136 <sup>b</sup>	(LIBAULT et al., 2008)
Cons 15	AW396185 <sup>b</sup>	(LIBAULT et al., 2008)
EEF1-a	AK061464 <sup>a</sup>	(ZHANG et al., 2009)
Pv 18S	AF207040 <sup>b</sup>	(SANTOS et al., 2005)
Pv ACT	****	(CHEN et al., 2009)
Pv UBC9	****	(HERNÁNDEZ et al., 2007)
T197	****	(THIBIVILLIERS et al., 2009)
TC127	****	(THIBIVILLIERS et al., 2009)
TC185	****	(THIBIVILLIERS et al., 2009)
UBQ5	AK061988 <sup>a</sup>	(JAIN et al., 2006)

<sup>a</sup>AV530631 literatura foram escolhidos na literatura e 2 - Full-length cDNA accession number.

<sup>b</sup> - GenBank accession no.

A estabilidade dos genes de referência avaliados foi conduzida utilizando os algoritmos NormFinder (ANDERSEN et al., 2004), DataAssist™ v3.01 (Life Technologies Corporation) e Genorm<sup>PLUS</sup> (VANDESOMPELE et al., 2002). Para os algoritmos NormFinder e DataAssist™ v3.01 foi considerado o score gerado onde o menor valor representa o gene com expressão mais estável entre os tecidos avaliados. Para o Genorm<sup>PLUS</sup> adotou-se os parâmetros  $M \leq 0,5$  e  $CV \leq 0,2$ .

## Resultados e Discussão

As amostras de RNA apresentaram qualidade e quantidade adequadas para serem utilizadas na análise de RT-qPCR. As leituras espectrofotométricas nas razões 260nm/280nm e 260nm/230nm, indicaram um satisfatório grau de pureza, variando de 1,86 a 2,14 e de 1,11 a 2,36, respectivamente. Quanto à integridade inferida a partir do valor de *RNA Integrity Number* (RIN) observou-se uma variação de 6,2 a 9,6 indicativa de uma qualidade satisfatória para a análise de expressão gênica. As estimativas derivadas das razões dos RNAs 28S e 18S variaram de 1,0 a 2,4 indicaram integridade das frações ribossomais.

Apesar do perfil adequado quanto à pureza e qualidade das amostras de RNA houve variação individual na quantidade do RNA extraído para cada amostra (113,6 a 1594ng/ul) o que, segundo CHUNG et al (2006), não representa qualquer limitação ao processo de extração uma vez que quantidade e qualidade são fatores independentes na extração do RNA.

Durante o procedimento de titulação de *primers*, 13 dos 18 candidatos apresentaram formação de dímeros de *primers* em todas as concentrações avaliadas que variaram de 50nM a 900nM para cada um dos iniciadores, inviabilizando a utilização dos mesmos em sistemas de detecção baseados em SyberGreen. A ocorrência desses dímeros de primers nos 13 genes de referência foi confirmada através da análise *in silico* utilizando o programa computacional Gene Runner v.3.01 (Hastings Software, Inc.), corroborando com o resultado da titulação. Ao final, cinco genes de referência (Pv18S, PvAct,  $\beta$ -Tubulina, T 197 e Tc 127) selecionados por não apresentarem a formação de dímeros nas concentrações ajustadas foram utilizados na RT-qPCR para avaliação quanto à estabilidade de expressão nas amostras.

A análise dos dados gerados via RT-qPCR revelou um comportamento distinto dos cinco genes de referência em relação às diferentes amostras utilizadas no experimento. Na tabela 2 são apresentados os melhores padrões de amplificação em relação à especificidade de estabilidade no conjunto de seis grupos de amostras avaliadas. Dos cinco genes restantes, o da  $\beta$ -Tubulin se destacou por apresentar estabilidade de expressão na maioria dos tecidos avaliados, como o foliar derivado dos genótipos referentes aos pools gênicos Andino e Mesoamericano, semente e raiz. Os genes T197 e Pv18S apresentaram perfil estável de amplificação em tecido de vagem e raiz, enquanto o PvAct foi considerado adequado para raiz e semente. Esses genes apresentaram estabilidade de expressão nos tecidos na presença e ausência dos estresses bióticos e abióticos.

Tabela 2. Genes considerados estáveis para os grupos amostrais após a análise dos dados.

Genes avaliados quanto à estabilidade	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
$\beta$ -Tubulin	estável	estável	estável	estável	estável	
Pv 18S		estável				estável
Pv Act		estável		estável		
T197	estável	estável		estável		estável
Tc127	estável		estável	estável	estável	

Os genes de referência selecionados, segundo os experimentos realizados, servirão como controles internos em todas as RT-qPCT subsequentes às avaliações de RNA-seq sob análise com a espécie *Phaseolus vulgaris*. Os resultados derivados desse estudo darão suporte às pesquisas científicas que visam ampliar o conhecimento sobre os mecanismos genéticos que afetam características de interesse para o programa de melhoramento do feijoeiro comum.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa através de projeto universal e ao Centro Nacional de Pesquisa em Arroz e Feijão (Embrapa Arroz e Feijão) pela concessão de bolsa de iniciação científica.

**Referências**

- ANDERSEN, CL et al. (2004). Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**. 5245-5250.
- BLAIR MW et al. (2011) Construction and EST sequencing of full-length, drought stress cDNA libraries for common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Plant Biology**.
- BORGES A et al. (2012) Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. **Plant Cell Reporter**. 827-838.
- CHEN, L et al. (2011). Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. **Planta**. 377-390.
- CHUNG, JY et al. (2006). Optimization of recovery of RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue **Diagnostic Molecular Pathology**. 229-236.
- CZECHOWSKI, T et al. (2005). Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in Arabidopsis. **Plant Physiology**. 5-17.
- ETICHA, D et al. (2010). Transcriptomic analysis reveals differential gene expression in response to aluminium in common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. **Annals of Botany**. 1119-1128.
- HEID, CA et al. (1996). Real Time Quantitative PCR. **Genome Methods**. 986-994.
- HERNÁNDEZ, G et al. (2007). Phosphorus Stress in Common Bean: Root Transcript and Metabolic Responses. **Plant Physiology**. 752-767.
- HUGGETT, J et al. (2005). Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. **Gene and Immunity**. 1-6.
- JAIN, M et al. (2006). Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 646-651.
- LIBAULT, M et al. (2008). Identification of Four Soybean Reference Genes for Gene Expression Normalization. **The Plant Genome**. 44-54.
- SALVADOR, CA. (2011). Análise da conjuntura agropecuária safra 2011/12- Feijão. **Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado do Paraná**.
- SANTOS, MO et al. (2005) Expression of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1(SERK1)* gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume e *Medicago truncatula*. **Plant Science**. 723-729.
- THIBIVILLIERS, S et al. (2009). Generation of *Phaseolus vulgaris* ESTs and investigation of their regulation upon *Uromyces appendiculatus* infection. **BMC Plant Biology**.
- VANDESOMPELE J et al. (2002) . Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**. 2002.
- ZHANG, JL et al. (2009) **Expression Pattern of GS3 During Panicle Development in Rice under Drought Stress: Quantification Normalized Against Selected Housekeeping Genes in Real-Time PCR**. **Asian Journal of Plant Sciences**. 285-292.