

SELEÇÃO DE GENES ENDÓGENOS PARA ANÁLISES DE qRT-PCR EM SEMENTES DE CAFÉ¹

Juliana Camargo Martinati Schenk²; Danielle Cunha Cardoso³; Mirian Perez Maluf⁴; Lilian Padilha⁵

1 Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

2 Bolsista Pós-Doc CNPq, Embrapa Café/IAC, SP, julianamartinati@gmail.com

3 Bolsista Consórcio Pesquisa Café, Embrapa Café/IAC, SP, danielleccard@yahoo.com.br

4 Pesquisador, PhD, Embrapa Café, Brasília-DF. mirian.maluf@embrapa.br

5 Pesquisador, DSc, Embrapa Café, Brasília-DF. lilian.padilha@embrapa.br

RESUMO: A técnica quantitativa de PCR em tempo real, qRT-PCR, permite analisar a expressão de genes alvo em diferentes condições experimentais. No entanto, 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. Os genes normalizadores escolhidos para as análises em sementes podem diferir daqueles utilizados para as raízes e folhas. Este trabalho teve como objetivo a avaliação de genes normalizadores úteis ao estudo de expressão gênica em sementes. O experimento englobou sementes mantidas nos frutos, sementes desmuciladas mecanicamente ou por meio da fermentação. Essas sementes e frutos foram em seguida, secados à sombra ou em secador até atingirem os teores de água de 12% ou 35%, foram acondicionados em embalagens herméticas e mantidos em câmara fria (10°C/ 40%UR) por um período de até 12 meses. Foram avaliados 11 genes candidatos a normalizadores, os quais foram escolhidos, previamente, em um estudo de microarranjos. As expressões e estabilidade destes genes foram avaliadas por meio dos softwares *geNorm*, *NormFinder*, *Delta Ct* e *BestKeeper*. Pela análise conjunta dos resultados obtidos a partir destes softwares, observou-se que a estabilidade de um gene normalizador é variável em função do fator experimental considerado. O gene da actina é indicado como normalizador nas análises de expressão gênica em sementes de café quando forem considerados todos os três fatores avaliados neste estudo, ou seja, processamento, secagem e armazenamento.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea arabica*, expressão gênica, genes endógenos, processamento, armazenamento.

ENDOGENOUS GENES FOR qRT-PCR ANALYSIS IN COFFEE SEEDS

ABSTRACT: Quantitative Real-Time PCR technique allows the evaluation of gene expression in a wide range of experimental conditions. However, the accuracy of qRT-PCR is highly correlated to the endogenous or normalizing gene, which should provide similar expression profile for different samples in the assay. Normalizing genes chosen for analysis in seeds may differ from those used for roots and leaves. This study aimed to evaluate the normalizing genes useful for the study of gene expression in coffee seeds. The assay comprised seeds kept in fruits, seeds that mucilage was removed mechanically or by fermentation. These seeds and fruits were dried under shade or in a mechanical dryer until they reach 12% or 35% of moisture content. Afterward, they were placed in airtight containers and were stored under 10°C/40%RH for 12 months. A total of 11 candidate genes, chosen based on previous microarray study, were evaluated for normalizing qRT-PCR. The expression and stability of these genes were evaluated using four softwares: GeNorm, NormFinder, Delta Ct and BestKeeper. Our results show that the stability of normalizing gene is variable and related with each experimental factor considered. The Actin is the normalizing gene indicated for expression analysis in coffee seeds when all three factors (processing, drying and storage) are considered together in this analysis.

KEY WORDS: *Coffea arabica*, normalizing genes, gene expression

INTRODUÇÃO

Em experimentos utilizando a técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR) muitas variáveis podem interferir nos resultados das expressões gênicas relativas, tais como a quantidade inicial de amostra, qualidade do RNA, eficiência da amplificação e a seleção correta de genes normalizadores. Entre esses fatores a escolha dos genes normalizadores é um pré-requisito fundamental para a obtenção de resultados confiáveis (Pfaffl et al., 2004). Um bom gene normalizador pode ser definido como aquele gene cuja expressão é estável entre as amostras e não sofre alteração com os diferentes tratamentos aplicados. Além do mais ele não deve estar ligado a pseudo-genes evitando, assim, ampliações do DNA genômico e apresentar um *threshold cycle* ou *Ct* entre 18 e 22, também é desejável (Hongjian et al., 2010). Sabe-se que, mesmo a expressão destes genes pode diferir em diferentes tecidos das plantas como folhas, raízes e sementes. Uma condição ideal seria aquela em que adversidades ambientais, e mesmo experimentais, não influenciassem a expressão gênica destes genes (Schmittgen & Zakrajsek, 2000). No entanto, muitos estudos mostram que os principais genes

constitutivos também estão sujeitos a tais influências e podem variar, consideravelmente, em diferentes condições ambientais (Thellin et al., 1999; Stürzenbaum & Kille, 2001; Radonic et al., 2004). Apesar de já terem sido descritos genes normalizadores em café (Cruz et al., 2009; Barsalobres-Cavallari et al., 2009), até o momento genes normalizadores ainda não foram avaliados em sementes de café arábica.

A estabilidade dos genes normalizadores pode ser detectada a partir de *softwares* específicos que consideram os dados da expressão desses genes em diferentes condições experimentais. Dentre os programas disponíveis, o *GeNorm* (Vandesompele et al., 2004) classifica os genes testados baseado na estabilidade dos valores de expressão M . O mais estável possui o menor valor de M enquanto que o menos estável tem o maior valor de M . O valor M é a média do pareamento da variação de um gene particular contra todos os outros genes testados. *NormFinder* é um outro algoritmo utilizado para identificar a normalização ótima de um dado gene entre um conjunto de genes candidatos a genes de referência (Andersen et al., 2004). Ele classifica um grupo de genes candidatos normalizadores de acordo com a estabilidade da expressão em um dado conjunto de amostras. *BestKeeper* avalia a estabilidade da expressão gênica para todos os genes individuais baseado em três variáveis: Desvio padrão (DP), coeficiente de correlação (r) e porcentagem de covariância (PC) (Pfaffl et al., 2004). Todos os genes são reunidos em um índice e a correlação entre cada gene candidato e este índice é calculado baseando-se nos valores individuais de Ct com a média geométrica dos genes candidatos. Os genes cujos valores de DP forem maiores que “um” são considerados inconsistentes e são excluídos das análises. O método do *Delta Ct* (Silver et al., 2006) analisa o menor índice de variabilidade entre os Ct das amostras testadas.

Com o objetivo de validar genes candidatos a normalizadores, neste trabalho, 11 genes foram identificados a partir de análises prévias de microarranjo, e a estabilidade deles foi avaliada no cDNA de sementes de café submetidas aos processamento natural, desmucilado e fermentado, secadas a sombra ou em secador até os teores de água de 12 e 35%. Estas sementes foram armazenadas em câmara fria por de 0, 4, 8 e 12 meses.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal:

Foram utilizadas sementes de *C. arabica* cultivar Catuaí Amarelo IAC 62. Frutos de café cereja foram submetidos a ou não ao processamento para retirada da mucilagem, resultando em três tratamentos: a) café ao natural ou café em côco, onde os frutos não foram descascados ou desmucilados; b) desmucilação mecânica das sementes; c) desmucilação das sementes pela fermentação. Em seguida, as sementes e o café ao natural foram secados à sombra ou em secador até atingirem os teores de água de 12% ou 35%, acondicionadas em embalagens herméticas e mantidas em câmara fria (10°C/ 40%UR) por um período de até 12 meses. As amostragens foram realizadas cada quatro meses.

Extração do RNA total e síntese do cDNA:

O RNA total foi extraído de 5 g de sementes maceradas em nitrogênio líquido, utilizando o protocolo sugerido por Chang et al. (1993). A dosagem do RNA total foi feita em espectrofotômetro UV diluído em 50x, medindo-se a absorbância a 230_{nm}, 260_{nm} e 280_{nm}. Os cálculos foram feitos de acordo com Sambrook et al. (1989). A integridade do RNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio. Todas as amostras de RNA foram tratadas com DNase para a remoção total de DNA genômico. Após este tratamento, 500ng do RNA foram submetidas à síntese de cDNA para análise de funcionalidade (*RevertAid™ Minus First Strand cDNA Synthesis Kit - Fermentas*). Em seguida foi realizada a amplificação do gene β -Actina para validação dos cDNAs e somente após o resultado positivo é que foram realizadas as análises de expressão gênica.

Seleção e análise da expressão dos genes candidatos a normalizadores:

Foram avaliados 11 genes previamente selecionados em estudos de microarranjos realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Café do IAC (Tabela 1). Esta seleção considerou os valores de *fold change* não significativos nas amostras testadas no experimento do microarranjo. Os resultados das expressões absolutas (valores de Ct) foram avaliados pelos programas *Best Keeper* (Pfaffl et al., 2004), *GeNorm* (Vandesompele et al., 2004), *NormFinder* (Andersen et al., 2004), e *DeltaCt* (Silver et al., 2006), os quais permitiram determinar a estabilidade da expressão destes genes nas sementes submetidas aos diferentes tipos de processamento, secagem e períodos de armazenamento das sementes.

Para as análises de expressão dos genes alvo foi utilizado o kit foi Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X) - Fermentas. As reações foram conduzidas em termociclador ABI Prism 7700 Sequence Detection System sob as condições descritas: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 45 ciclos de 95°C por 2 min/62°C por 30 seg/72°C por 30 seg. Os dados foram coletados na última fase (extensão). As temperaturas de dissociação do amplicon variaram de 78°C a 85°C e indicaram a amplificação de um produto específico (alvo). Para calcular a eficiência da reação foi usada a fórmula: $E=[10^{-1/\text{slope}}]^{-1}$. As reações tiveram repetições representativas e foram feitas em triplicata.

Tabela 1. Genes normalizadores selecionados para o estudo em sementes de café submetidas a diferentes processamentos e secagem em diferentes tempos de armazenamento.

Abreviação	Anotação
UBQ	Ubiquina carboxil-terminal hidrolase
Act	Actina
GAPDH	GAPDH
40S	40S ribossomal
Chap	Chaperona
PUBQ	Poli Ubiquitina
GAPDH.2	GAPDH
FRC	Fator remodelador de cromatina
UBQ lig	Ubiquitina ligase
H1.5	Histona H1.5
PolyA	Poli Ubiquitina A

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos géis de agarose pôde ser verificada que a extração do RNA de sementes utilizando-se o LiCl permitiu a obtenção de RNA de alta qualidade. As sementes possuem grande quantidade de polissacarídeos, os quais interferem diretamente na qualidade do RNA e, conseqüentemente, nas análises de qR-TPCR. Os valores absolutos de quantificação (ng/ μ L) e relação A_{260}/A_{280} que apresentou relação próxima a 2,0 foram os indicadores considerados na avaliação da qualidade do RNA.

Os genes escolhidos pertencem a diferentes classes funcionais que incluem genes estruturais e genes que participam de metabolismo de outras moléculas. Pelas análises com curvas de dissociação de pico único, pode ser verificado que todos os genes testados amplificaram apenas um fragmento específico. A grande maioria dos autores admite a utilização de apenas um gene endógeno como controle das reações (Brunner et al., 2004; Czechowski et al., 2005; Gutierrez et al., 2008), no entanto outros trabalhos relatam a utilização de dois ou mais endógenos (Exposito-Rodrigues et al., 2008; Tong et al., 2009). Neste trabalho foi avaliada a estabilidade de 11 genes em diferentes condições experimentais, sendo classificados os cinco genes mais estáveis em cada interação, e sugere-se o uso isolado ou combinando de dois ou mais genes endógenos na mesma reação.

Em média, os valores de Ct's para todos os genes normalizadores testados foram entre 20 e 24. A tabela 2 sintetiza a classificação obtida pelos programas utilizados na avaliação da estabilidade destes nas amostras de RNA das sementes de café submetidas aos diversos tratamentos. Quando os três métodos de processamento foram analisados sem considerar o processo de secagem, o gene ribossomal 40S foi o que apresentou maior estabilidade, sendo o primeiro na classificação consenso dos quatro programas utilizados. Este gene foi seguido pelos genes ubiquitina e H1.5 (histona). Por outro lado, analisando cada tipo de processamento separadamente, obteve-se maior estabilidade para genes diferentes em cada um destes, sendo o GAPDH mais estável no processamento natural, a poliubiquitina A no tratamento fermentado e o gene 40S ribossomal na desmucilação mecânica. Quando analisados todos os processamentos em conjunto o gene mais estável foi o gene da actina.

Mesmos os genes constitutivos mais utilizados e que participam de processos celulares básicos das células podem ter seus perfis de expressão alterados em diferentes condições experimentais e diferentes tecidos (Gutierrez et al., 2008). Neste trabalho os resultados corroboram com os observados por Gutierrez et al. (2008), onde a classificação da estabilidade dos genes foi variável em função do tipo de processamento e secagem das sementes. Desta maneira, os resultados sugerem que para cada tipo de estudo de expressão gênica deve ser selecionado um gene normalizador que melhor se adeque às análises. Esta mesma situação pôde ser verificada para o estudo de genes de defesa em cafeeiros sob diferentes condições de estresse, seja biótico ou abiótico e em diferentes tecidos vegetais.

Tabela 2. Consenso entre programas *Genorm*, *NormFinder*, *BestKeeper* e *Delta Ct*, resultando na classificação e ranqueamento dos cinco melhores genes normalizadores nas condições experimentais que consideraram os diferentes tipos de processamento, secagem e períodos de armazenamento das sementes.

Processamento	Umidade	Secagem	Armazenamento (em meses)	Classificação				
				1o.Lugar	2o.Lugar	3o.Lugar	4o.Lugar	5o.Lugar
Natural - Desmucilado - Fermentado	12% e 35%	Secador e sombra	0,4, 8 e 12	Act	PolyA	40S	UBQlig	FRC
Natural	12% e 35%	Secador e sombra	0,4, 8 e 12	GAPDH	PolyA	Chap	UBQ	FRC
Fermentado	12% e 35%	Secador e sombra	0,4, 8 e 12	PolyA	PUBQ	40S	UBQlig	FRC
Desmucilado	12% e 35%	Secador e sombra	0,4, 8 e 12	40S	UBQ	H15	UBQlig	GAPDH
Natural - Desmucilado - Fermentado	Não	Não	Não	40S	UBQ	H15	GAPDH	GAPDH.2

CONCLUSÕES

A estabilidade de um gene normalizador é variável em função das condições experimentais. O gene da actina é o gene normalizador indicado para estudos que combinam os efeitos do processamento, secagem e armazenamento sobre a qualidade das sementes de café arábica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, C.L., JENSEN, J.L., ØRNTTOFT, T.F. 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* 64(15): 5245-5250 (2004).
- BARSALOBRES-CAVALLARI, C., SEVERINO, F., MALUF, M.P., MAIA, I. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *BMC molecular biology* 10(1):1 (2009).
- BRUNNER AM, YAKOVLEV IA, STRAUSS SH: Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biology* 4(1):14 (2004).
- CHANG, S., PURYEAR, J., CAIRNEY, J. A single and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant molecular Biology* 11:113-116 (1993).
- CRUZ, F., KALAOUN, S., NOBILE, P., COLOMBO, C., ALMEIDA, J., BARROS, L.M.G., ROMANO, E., GROSSI-DE-SA, M., VASLIN, M., ALVES-FERREIRA, M. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. *Mol Breed* 23:607-616 (2009).
- CZECHOWSKI, T., STITT, M., ALTMANN, T., UDVARDI, M.K., AND SCHEIBLE, W.R.. Genomewide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139: 5–17 (2005).
- EXPOSITO-RODRIGUEZ M, BORGES A, BORGES-PEREZ A, PEREZ J: Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biology* 8(1):131 (2008).
- GUTIERREZ, L., MAURIAT, M., GUE'NIN, S., PELLOUX, J., LEFEBVRE, J.-F., LOUVER, R., RUSTERUCCI, C., MORITZ, T., GUERINEAU, F., BELLINI, C., AND VAN WUYTSWINKEL, O.. The lack of a systematic validation of reference genes: A serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnol. J.*, (2008)
- HONGJIAN, W., ZHENGUO, Z., CHUNTAO, Q., YIHU, S., AHMED, A., MALIK, J.C. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber *Analytical Biochemistry* 399(2):257–261 (2010).
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning. A laboratory manual. New York Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 417p., 1989.
- PFAFFL, M.W., TICHOPAD, A., PRGOMET, C., NEUVIANS, T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters* 26:509-515 (2004).
- RADONIC, A., THULKE, S., MACKAY, I.M., LANDT, O., SIEGERT, W., NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313, 856–862 (2004).
- SILVER, N., BEST, S., JIANG, J., THEIN, S.L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC molecular biology* 7:33 (2006).
- SCHMITTGEN, T., ZAKRAJSEK, B.A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 46, 69–81 (2000).
- STURZENBAUM, S.R., KILLE, P. Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 130, 281–289 (2001).
- THELLIN, O., ZORZI, W., LAKAYE, B., DE BORMAN, B., COUMANS, B., HENNEN, G., GRISAR, T., IGOUT, A., HEINEN, E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* 75, 291–295 (1999).