

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise de genes de referência para estudos de expressão gênica em *Eucalyptus globulus* Labill durante o processo de enraizamento adventício através da técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real

Márcia Rodrigues de Almeida

Porto Alegre

2009

Márcia Rodrigues de Almeida

Análise de genes de referência para estudos de expressão gênica em *Eucalyptus globulus* Labill durante o processo de enraizamento adventício através da técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real

Monografia submetida ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Arthur Germano Fett-Neto
Co-orientadora: Carolina Michels Ruedell

Porto Alegre
2009

AGRADECIMENTOS

À minha família, pela compreensão, por acreditarem em mim desde o início, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas, pelos pensamentos positivos diante de cada desafio e pelas sábias palavras diante de cada dificuldade. Vocês certamente são o meu porto seguro. Amo vocês...

Ao meu orientador, Professor Arthur, pela confiança depositada e principalmente por acreditar no meu potencial. Tu és um exemplo de profissionalismo e dedicação à ciência e eu tenho imensa admiração por ti...

À Carol querida, co-orientadora mais doce e paciente do mundo e parceira de trabalho incomparável. Tornou-se amiga do peito e maior incentivadora. Obrigada pela confiança, pela compreensão e principalmente pela amizade sempre...

À Joséli, eterna “chefa”, que me ensinou os primeiros passos da pesquisa e é dona de conselhos valiosíssimos. Te admiro muito e tenho um orgulho enorme da nossa amizade e de ter sido tua “pupila” ...

Ao *Rice Team*, Vini, Palomita, Lívia, Kaka e Edi, pela enorme ajuda e valiosas dicas nos primeiros passos da Biologia Molecular, em especial Raul e Felipe, os quais tiveram “*paciência de Jó*” mesmo diante das perguntas mais estúpidas, das dúvidas intermináveis e dos pedidos de socorro frequentes. Vocês foram cruciais pra que eu conseguisse...

Aos demais amigos queridos do Laboratório de Fisiologia Vegetal, Ná, Kel, Hélio, Fer, Anna, Carina, Gelson... a rotina definitivamente não faz parte dos nossos dias e é isso que torna nosso grupo tão divertido...

Ao Professor Giancarlo Pasquali, pelo auxílio no acesso ao Banco de Dados do Projeto Genolyptus e pela gentil doação de alguns pares de *primers*.

ÍNDICE

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	8
1.1 O Eucalipto	8
1.2 Enraizamento adventício e <i>Eucalyptus globulus</i>	9
1.3 Auxina	10
1.4 PCR Quantitativo em Tempo Real e Genes referência	12
2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivos Específicos	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Material Vegetal	19
4.2 Experimentos de enraizamento <i>in vitro</i>	19
4.3 Escolha das sequências e delineamento dos <i>primers</i>	20
4.4 Extração de RNA e Síntese de cDNA	22
4.5 PCR Quantitativo em Tempo Real	22
4.6 Análise dos dados	23
5 RESULTADOS	24
6 DISCUSSÃO	29
7 CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS	41

RESUMO

O enraizamento adventício é uma etapa crucial na propagação vegetativa de plantas lenhosas de interesse econômico como o eucalipto. *Eucalyptus globulus* e seus híbridos interespecíficos possuem recalcitrância ao enraizamento, porém são de grande interesse para a região Sul, devido ao baixo teor de lignina e tolerância à geada. Um melhor entendimento deste processo poderia auxiliar na engenharia genética desta espécie melhorando a produtividade das florestas plantadas. O PCR Quantitativo em Tempo Real é o método de maior sensibilidade e especificidade na análise de transcritos atualmente. Através dele é possível analisar a expressão de genes de interesse em determinada condição experimental. Entretanto, a confiabilidade dos resultados depende da escolha correta do gene de referência, o qual deve apresentar uma expressão constitutiva em todos os tratamentos. Trabalhos recentes demonstram que não há nenhum gene universalmente constitutivo, portanto vários algoritmos foram desenvolvidos para auxiliar na validação de genes-referência. Neste trabalho, sete genes considerados constitutivos foram analisados em diferentes amostras de *E. globulus* ao longo das fases do enraizamento adventício *in vitro* através do software *geNorm*. Os resultados indicaram NADP-Isocitrato desidrogenase (*IDH*) como o gene mais estável juntamente com uma suposta proteína de ligação a RNAs (*EUC12*), seguidos de uma proteína da família SAND (*SAND*). Genes tradicionalmente utilizados como referências em estudos com plantas como α -Tubulina (*TUA*), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), Poliubiquitina (*PUBQ*) e Ribonucleoproteína L23 (*RIB*) apresentaram expressão altamente variável e não são recomendados para uso como referências em *E. globulus* durante o enraizamento adventício. A expressão de um possível ortólogo ao gene *Argonauta 1* (*AGO1*) de *Arabidopsis thaliana* em *E. globulus*, provavelmente envolvido com a regulação de alguns fatores de resposta à auxina (*ARFs*), foi analisada utilizando como referências o gene mais estável e o mais variável dentre as análises, o que resultou em padrões diferentes de expressão. Este resultado confirma a importância da escolha adequada do gene de referência em estudos de expressão gênica, permitindo a confiabilidade dos resultados.

ABSTRACT

Adventitious rooting is an essential step on the vegetative propagation of woody plants of economic interest like eucalyptus. *Eucalyptus globulus* and its interespecific hybrids show rooting recalcitrance; however, these genotypes are of great interest to southern Brazil, due their low lignin content and frost tolerance. A better understanding of adventitious rooting could help attempts to genetic engineering this species, improving plant forest productivity. Currently, the Quantitative Real Time PCR is the most sensitive and specific method for transcript analysis, allowing the evaluation of expression of genes of interest in a certain experimental condition. However, the accuracy of the results depends on the correct choice of the reference gene, which should have a constitutive expression during treatments. Recent studies have shown that there is no universal reference gene for all conditions and species, so several algorithms have been developed to help validate reference genes to particular situations. In this work, seven putative constitutive genes were investigated in different *E. globulus* samples throughout the *in vitro* adventitious rooting phases, using the *geNorm* software. The results indicated that NADP-Isocitrate dehydrogenase (*IDH*) is the most stable gene together with a putative RNA binding protein (*EUC12*), followed by a SAND family protein (*SAND*). Commonly used reference genes in plant studies such as α -Tubulin (*TUA*), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), Polyubiquitin (*PUBQ*) e Ribonucleoprotein L23 (*RIB*) showed highly variable expression and are not recommended for use as constitutive controls in adventitious rooting of *E. globulus*. The expression of the putative ortologue of *Arabidopsis thaliana* Argonaute 1 (*AGO1*) in *E. globulus*, a gene involved in regulating auxin response factors (ARFs), was investigated using as reference genes those that displayed the most stable or the most variable expression profile, yielding distinct expression patterns. This result confirms the importance of appropriate reference gene choice in expression studies in order to afford reliable results.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Eucalipto

O eucalipto, originário da Austrália, pertence à família Myrtaceae e é uma espécie lenhosa de grande importância econômica, sendo o seu uso industrial uma das atividades que mais se expande no setor florestal mundial. Isto se deve ao seu potencial como matéria-prima para diversos setores, principalmente o de papel e celulose, além de prover madeira para produção de mourões e postes, carvão para siderurgia, mel, taninos e óleos essenciais, principalmente para produtos de limpeza e aromatizantes (SOUZA & LORENZI, 2008). No Brasil, os produtos de base florestal representam aproximadamente 2,6% do produto interno bruto (PIB) (VITAL, 2007). Sendo uma planta de rápido crescimento (cerca de seis a oito anos), florestas de eucalipto podem ser uma alternativa para suprir a demanda por biomassa lenhosa evitando a devastação de florestas nativas (FOGAÇA, 2003). Além disso, as plantações florestais comerciais contribuem para a remoção do excesso de dióxido de carbono da atmosfera, já que são compostas por árvores jovens, com alta taxa de fotossíntese, reduzindo um dos grandes causadores do aquecimento global.

O Brasil ocupa o sétimo lugar em área com florestas plantadas (FAO, 2005), sendo 4,259 mil ha de eucalipto, o que corresponde a 0,6% do território nacional (ABRAF, 2009), e é líder mundial na produção de polpa para celulose de fibra curta, a qual é utilizada no fabrico de papéis de impressão dentre outros papéis finos. A eucaliptocultura brasileira é baseada principalmente em florestas clonais formadas a partir de materiais elite (MORA & GARCIA, 2000). Características encontradas nas árvores de plantações comerciais como troncos retos, com baixa densidade de ramificações, além da excelente qualidade das fibras e adaptabilidade a diversos tipos de solo faz do eucalipto uma arbórea ideal para cultivos comerciais (POKE *et al*, 2005).

1.2 Enraizamento adventício e *Eucalyptus globulus*

A propagação vegetativa é a técnica mais amplamente utilizada para multiplicar plantas-elite, sejam aquelas obtidas em programas de cruzamento ou as selecionadas a partir de populações naturais (HARTMANN *et al*, 1990). O enraizamento adventício é uma etapa indispensável para a propagação (DE KLERK *et al*, 1999) de espécies lenhosas de interesse econômico, como o eucalipto. O enraizamento adventício pode ser dividido em duas fases principais, as quais possuem diferentes requerimentos hormonais: (1) indução, correspondendo a eventos moleculares e bioquímicos, sem mudança morfológica visível, e (2) formação, que compreende divisões celulares envolvidas na organização do meristema da raiz e estabelecimento do primórdio radical, seguido do alongamento e emergência da raiz (FETT-NETO *et al*, 2001).

A formação de raízes adventícias é comum a todas as plantas vasculares, podendo se desenvolver em diversos pontos ao longo do corpo da planta. Em caules jovens geralmente se originam do parênquima vascular ou cortical e antes de emergirem, desenvolvem promeristema, coifa, cilindro vascular e córtex. É o sistema radical característico de estacas para propagação vegetativa, ao contrário de plântulas, as quais apresentam raízes pivotantes fortemente gravitrópicas, com raízes primárias, a partir das quais surgem as raízes secundárias (ESAU, 1974). Plantas com raízes adventícias são mais sujeitas ao tombamento, já que este tipo de arquitetura radical proporciona menor capacidade de sustentação.

Múltiplos fatores podem interferir no enraizamento adventício, como fitormônios, compostos fenólicos, condição nutricional e características genéticas (HAND, 1994), assim como respostas associadas ao estresse, o que torna este processo bastante complexo. Uma correta modulação destes fatores poderia melhorar a qualidade do sistema radical, permitindo o estabelecimento da planta até a idade adulta.

Um aspecto que trouxe inúmeros avanços ao estudo da rizogênese adventícia foi a utilização do cultivo *in vitro*. Esta técnica, além de possibilitar experimentos com explantes menores, como segmentos de caule, viabiliza o fornecimento de fitormônios e vitaminas e a adição controlada de componentes inorgânicos e carboidratos, além de

diminuir significativamente a chance de degradação microbiana dos mesmos (VAN DER KRIEKEN *et al*, 1993).

Eucalyptus globulus, bem como alguns de seus híbridos interespecíficos, apresentam características interessantes à indústria de papel e celulose do sul do Brasil, como a tolerância à geada, característica do inverno da região Sul, e o baixo teor de lignina, já que a mesma interfere negativamente na extração da celulose (FETT-NETO *et al*, 2001), aumentando os custos finais de produção. Enquanto *E. globulus* possui cerca de 22% de lignina em sua composição, *Eucalyptus grandis*, uma das espécies do gênero mais plantadas em todo o mundo, possui 24% (BASTOLLA, 2007). Entretanto, *E. globulus* apresenta baixa capacidade de enraizamento, sendo considerada recalcitrante (LE ROUX & VAN STADEN, 1991 e SERRANO *et al*, 1996) com mudas difíceis de propagar. Neste âmbito, estudos visando caracterização e posterior otimização do enraizamento adventício nesta espécie, tanto em nível fisiológico como molecular, se mostram de grande valia para o possível aumento da produtividade das florestas plantadas.

1.3 Auxina

Auxinas são fitormônios envolvidos em processos essenciais para as plantas, como crescimento celular, alongamento do caule, dominância apical, formação da raiz, desenvolvimento de frutos e tropismos (TAIZ & ZAIGER, 2009). Desempenham papel central na determinação da capacidade de enraizamento, porém concentrações que são favoráveis para a indução deste processo bloqueiam o alongamento das raízes. Isto revela que as diferentes fases da rizogênese devem possuir requerimentos hormonais diferentes ou mesmo opostos (DE KLERK *et al*, 1999). As respostas ao enraizamento também são fortemente afetadas pelo conteúdo endógeno de auxina e sua taxa de transporte (FOGAÇA & FETT-NETO, 2005). O ápice da parte aérea é a principal fonte de auxina endógena. Caules apresentam um característico transporte ativo basípeto através de células parenquimáticas dos tecidos vasculares conduzido por transportadores de influxo e efluxo, chamados AUX1 e proteínas PIN, respectivamente (MUDAY & DELONG, 2001). A atividade de auxina envolve a ligação à proteína do tipo

F-box *TIR1*, desencadeando a degradação via proteasoma de proteínas *Aux/IAA*, que se encontram ligadas aos fatores de transcrição de resposta à auxina (*ARFs*), inibindo a ação destes. Uma vez que *Aux/IAA* são degradados, ocorre transcrição de genes ativados por auxina através da ação dos *ARFs* (DHARMASIRI *et al*, 2005; WOODWARD & BARTEL, 2005). Um mecanismo alternativo, o qual não envolve degradação de *Aux/IAA* e parece estar mais relacionado com resposta a ácido indol butírico (IBA) se dá através da proteína tipo fosfatase de dupla especificidade *IBR5* (receptor 5 de ácido indol butírico), a qual parece agir *downstream* ao reconhecimento da auxina pelo complexo SCF^{TIR1/AFB}-*Aux/IAA* (STRADER *et al*, 2008).

Em *E. globulus*, a aplicação de auxina exógena é necessária para um bom desenvolvimento radical em experimentos *in vitro*, porém ainda não se sabe se isto se deve a alguma alteração no mecanismo de transporte deste fitormônio ou se a taxa de auxina endógena nesta espécie é insuficiente para desencadear todas as respostas ao enraizamento. Como citado anteriormente, a auxina desempenha um papel extremamente importante no enraizamento, sendo muitas vezes determinante. Os fatores de resposta à auxina (*ARFs* – *Auxin Response Factors*) compõem uma família específica de proteínas que se ligam a DNA e controlam a transcrição de genes regulados por auxina. Eles se ligam aos elementos promotores de resposta à auxina (*AuxREs*), os quais se encontram em genes de resposta inicial a este fitormônio como *Aux/IAA*, *GH3* (cujos representantes codificam para uma enzima conjugadora de auxina ou componentes de resposta à luz via fitocromo A (JAIN *et al*, 2006) e *SAUR* (*small auxin-up RNAs*, envolvidas no transporte vesicular intracelular) e podem atuar tanto ativando como reprimindo tais genes. *ARF10*, *ARF16* e *ARF17* são potencialmente regulados por miRNAs, sendo que estes são sugeridos como tendo um possível papel na sinalização de auxina (revisado em MALLORY *et al*, 2005). *AGO1* pertence a uma família gênica bastante conservada entre os eucariotos, tendo papel crucial na regulação do silenciamento gênico pós-transcricional e mecanismos relacionados. As proteínas AGO são componentes essenciais do complexo de silenciamento induzido por RNA, levando mRNAs à degradação através de miRNAs. O papel do gene *AGO1* na rota de miRNAs e sua própria regulação por essa rota são cruciais para o desenvolvimento das plantas (revisado em SORIN *et al*, 2005).

O mutante *ago1* de *A. thaliana* apresenta um acúmulo de *ARF17* no hipocótilo e este gene, embora não totalmente caracterizado, parece estar mais relacionado com a ação repressora dos *ARFs*. Sendo assim, este acúmulo leva à repressão de alguns genes relacionados com *GH3*, culminando na inibição da formação de raízes adventícias em *ago1*. Além disso, perturbações na homeostase de auxina na parte apical das plântulas e hiper-regulação das rotas de sinalização pela luz podem contribuir para os defeitos na formação de raízes adventícias encontrados em *ago1* (SORIN *et al*, 2005).

1.4 PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR) e Genes referência

A formação do meristema radical em plantas lenhosas ainda é pouco compreendida no âmbito da expressão gênica (BUTLER & GALLAGHER, 1999). Utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real (ou qRT-PCR do inglês *real-time quantitative RT-PCR*) é possível avaliar a expressão de genes de interesse durante o processo de enraizamento adventício, bem como durante os diferentes estádios de desenvolvimento de uma planta.

O qRT-PCR é baseado no processo de transcrição reversa (RT) seguida da Reação em Cadeia da DNA-polimerase (PCR) com a incorporação de moléculas fluorescentes covalentemente ligadas ou não a nucleotídeos, as quais podem ser quantificadas durante a cinética da reação. Os produtos formados são monitorados a cada ciclo, o que permite uma detecção rápida e precisa dos produtos de amplificação. Atualmente é o método de maior sensibilidade e especificidade na análise de transcritos (GACHON *et al*, 2004).

Entretanto, esta técnica necessita de normalização para uma correta interpretação dos dados obtidos. O propósito desta etapa é “padronizar” eventuais variações associadas com os vários passos do procedimento experimental, como diferenças na quantidade inicial de amostra, integridade do RNA, eficiência na síntese do cDNA e diferenças na atividade transcricional nos tecidos e células analisados (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ *et al*, 2008). A normalização é realizada com base em um ou

mais genes que possuam expressão uniforme na maioria das células do organismo de estudo, bem como durante as várias fases de desenvolvimento e sob diferentes condições ambientais. Estes são os chamados genes constitutivos ou *housekeeping genes*. Considerando que tanto a sequência do gene constitutivo como a sequência do gene de interesse estarão presentes na amostra testada, ambos apresentarão o mesmo padrão de variação dentro do experimento, exceto em relação ao nível de expressão (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ *et al*, 2008). Geralmente são escolhidos genes envolvidos em processos celulares básicos como manutenção da estrutura celular e metabolismo primário (CZECHOWSKI *et al*, 2005; BASTOLLA, 2007). Embora vários genes sejam tradicionalmente utilizados e relatados como bons normalizadores em estudos com plantas, como codificadores do rRNA 18S, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), fator de alongamento 1 α (*EF-1 α*), actina (*ACT*), α tubulina (*TUA*) e β tubulina (*TUB*) (CZECHOWSKI *et al*, 2005), trabalhos recentes vem demonstrando que estes genes apresentam expressão instável entre tecidos e genótipos, não sendo adequados para utilização como controles em métodos sensíveis como o qRT-PCR (BRUNNER *et al*, 2004; CZECHOWSKI *et al*, 2005; GUTIERREZ *et al*, 2008; EXPÓSITO-RODRÍGUEZ *et al*, 2008). Além disso, Brunner *et al*, (2004) e Gutierrez *et al*, (2008) argumentam sobre a necessidade de uma determinação específica para a espécie de estudo, já que um bom gene-referência para uma espécie pode não apresentar expressão estável em outra, bem como sob diferentes condições experimentais.

Tendo em vista a necessidade de validar a estabilidade de expressão de genes candidatos a controles em experimentos de qRT-PCR, vários trabalhos tem sido desenvolvidos nos últimos anos, com as mais variadas espécies. Tal avanço se deve, em parte, ao desenvolvimento de ferramentas que permitem a identificação estatística dos melhores controles internos de um grupo de candidatos a normalizadores para um dado experimento. Dentre as mais utilizadas e bem sucedidas ferramentas encontra-se o software *geNorm* (VANDESOMPELE *et al*, 2002), o qual será utilizado no presente trabalho. *geNorm* é uma Aplicação Básica Visual (VBA) para *Microsoft Excel* que calcula automaticamente uma medida (M) de estabilidade de expressão para cada gene controle em um dado grupo de amostras. Além disso, o software indica o número

mínimo de genes necessário para uma normalização acurada dos dados, uma vez que seus autores sugerem a utilização de dois ou mais genes para normalização ao invés de apenas um. Embora inúmeros sejam os trabalhos que utilizam esta técnica para estudos de normalização em animais, leveduras e bactérias, a mesma ainda é pouco explorada no campo vegetal (GUÉNIN *et al*, 2009).

Ao analisar a expressão de dez possíveis genes controle no híbrido *Populus trichocarpa* x *P. deltoides*, em diferentes estádios de desenvolvimento e estações do ano, Brunner *et al* (2004) indicaram os genes codificadores da Poliubiquitina (*UBQ11*) e α -Tubulina como sendo os mais estáveis nas condições experimentais do estudo. Os genes analisados pertenciam a diferentes classes funcionais e famílias gênicas, todos já utilizados em estudos de expressão gênica em plantas, como ubiquitinas, actinas, tubulinas, ciclofilinas citosólicas, fator de iniciação traducional, fator de alongamento e rRNA. Neste trabalho os autores também indicam a utilização de *primers* específicos para amplificarem dois ou mais membros de uma família gênica controle, cujo nível de expressão combinado poderá resultar em maior estabilidade do que apenas um único gene.

Um dos trabalhos mais completos no campo de seleção de normalizadores para qRT-PCR foi desenvolvido por Czechowski *et al* (2005) com *Arabidopsis thaliana*. Foram avaliados mais de 23,5 mil genes, dentre referências tradicionais e centenas de novos genes nunca antes utilizados para tal, através de dados de microarranjo disponibilizados na plataforma *Affymetrix ATH1 GeneChips*. As condições experimentais incluíram 79 diferentes tecidos, órgãos, estádios de desenvolvimento e genótipos, além de estresses bióticos e abióticos e efeitos de fitormônios. As análises revelaram que centenas de genes presentes no genoma de *A. thaliana* possuem expressão mais estável e em níveis mais baixos do que genes-referência tradicionais. Os autores complementam que ortólogos desses novos genes em outras espécies podem servir para o mesmo propósito.

Nicot *et al* (2005), em um estudo com batatas (híbrido *Solanum phureja* x *S. tuberosum*), analisaram a estabilidade de sete genes bastante utilizados como referência (actina, β -tubulina, ciclofilina, fator de alongamento 1- α (ef1- α), rRNA 18S, adenina fosforribosil transferase e proteína ribossomal citoplasmática L2) em plantas

sob estresse biótico e abiótico. Os autores verificaram diferenças de estabilidade gênica entre os diferentes tratamentos de estresse, mostrando que as condições experimentais influenciaram a expressão da maioria dos genes testados, sendo que apenas o gene *ef1- α* apresentou expressão estável em todas as condições analisadas.

Com o objetivo de demonstrar que genes comumente utilizados como referência em estudos com plantas podem variar seu nível de expressão e levar a erros de interpretação das análises por qRT-PCR, Gutierrez *et al* (2008) analisaram a expressão de 14 genes, escolhidos dentre os mais utilizados na literatura, em 16 tecidos diferentes (órgãos e estádios de desenvolvimento) de *A. thaliana*. Os resultados mostraram que apenas dois genes, adenina fosforribosiltransferase 1 e ubiquitina 5, apresentaram expressão estável. Neste mesmo trabalho, foram analisados quatro genes normalizadores em *Populus* (híbrido *Populus tremula* x *P. tremuloides*) durante oito estádios de desenvolvimento e na região cambial. Apenas um dos genes apresentou estabilidade em todas as condições e o gene codificador do rRNA 18S se mostrou como o mais instável, embora seja amplamente utilizado.

Analisando a expressão de sete genes-referência tradicionais e quatro considerados como novas alternativas em tecidos e órgãos de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. ciliegia) em diferentes estádios de desenvolvimento, Expósito-Rodríguez *et al* (2008) verificaram que todos os genes tradicionais apresentaram menor estabilidade no nível de expressão do que os outros quatro genes testados. Os autores ainda recomendam a utilização de diferentes combinações dos genes mais estáveis para a normalização dos dados ao invés de apenas um gene.

Ao investigar a expressão de 11 genes-referência em diferentes amostras de pessegueiro (*Prunus persica*), Tong *et al* (2009) verificaram que os genes que codificam o fator de alongamento de tradução 2 (*TEF2*), ubiquitina 10 e RNA Polimerase II apresentaram expressão estável e podem ser utilizados como controles nessa espécie. Os autores recomendam ainda a utilização conjunta de dois ou mais genes como controle para uma normalização mais acurada dos dados. Os genes rRNA 18S, proteína ribossomal L13, fosfolipase A2, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e actina 2/7 apresentaram expressão altamente variável nas amostras testadas.

Embora várias espécies de dicotiledôneas tenham sido abordadas em trabalhos com genes constitutivos para normalização em qRT-PCR nos últimos anos, há menos informações acerca de espécies arbóreas. A representante deste grupo sobre a qual existem resultados mais consistentes é *Populus* sp. Em relação a eucalipto, existem apenas resultados parciais. Bastolla (2007) analisou a estabilidade de genes constitutivos tradicionais e alguns resultantes de análises de microarranjo com duas espécies de eucalipto, *Eucalyptus grandis* e *E. globulus*, plantadas a campo. Os resultados indicaram o gene codificador da proteína SAND e uma suposta proteína de ligação a RNAs (EUC12) como sendo os melhores controles para estudos em xilema e folhas maduras da referidas espécies.

Até o presente momento, no entanto, nenhum estudo de normalização foi realizado com plantas *in vitro* durante o processo de enraizamento adventício em eucalipto.

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o impacto econômico e ecológico da indústria de papel e celulose no Brasil, um melhor entendimento do processo de enraizamento adventício em *Eucalyptus globulus*, espécie de grande interesse para a região Sul, pode ser de grande valia para a otimização da prática florestal, visando obtenção de cultivos mais produtivos em menores extensões de terra. Para que isto seja possível, a determinação de genes-referência adequados para o estudo molecular da rizogênese adventícia nesta espécie se mostra de extrema importância, permitindo a confiabilidade dos resultados, além de servir como ponto de partida para estudos subsequentes.

3 OBJETIVOS

Analisar a expressão de genes de expressão constitutiva e utilizados como normalizadores em vários estudos com plantas como **PUBQ** - At4g05050 – Poliubiquitina (UBQ11) e **TUA** - At5g19780 - α -Tubulina (Brunner *et al*, 2004), **TIP41** - At4g34270 - Proteína semelhante às da família TIP41 (Czechowski *et al*, 2005; Gutierrez *et al*, 2008) **At4g33380** - Proteína expressa de *Arabidopsis thaliana* (Czechowski *et al*, 2005; Gutierrez *et al*, 2008), **SAND** - At2g28390 - Proteína da família SAND (Czechowski *et al*, 2005; Bastolla, 2007), **EUC12** – Suposta proteína de ligação a RNAs, **GAPDH** - At1g13440 – Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e **RIB** - Ribonucleoproteína L23 (Bastolla, 2007) e **IDH** - NADP Isocitrato Desidrogenase (Carvalho *et al*, 2008), através da técnica de PCR em tempo real durante o enraizamento adventício em *E. globulus*.

3.1 Objetivos Específicos

- Determinar o(s) gene(s) cuja expressão seja mais estável nas condições experimentais do presente estudo;
- Analisar a expressão, em *E. globulus*, de um gene relacionado com ação ou transporte de auxina utilizando como controle o gene mais estável dentre os testados;
- Analisar a expressão, em *E. globulus*, de um gene relacionado com ação ou transporte de auxina utilizando como controle o gene menos estável dentre os testados e verificar possíveis diferenças de expressão em relação ao gene mais estável;
- Recomendar um gene-referência adequado (com padrão estável de expressão) para estudos com enraizamento de *E. globulus in vitro*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

Sementes de *E. globulus* foram submetidas à esterilização superficial com etanol 70% durante 1 minuto e Hipoclorito de Sódio 1,5% durante 20 minutos, seguida de quatro lavagens com água destilada autoclavada. Aproximadamente 15 sementes foram colocadas em frascos de vidro de 300 mL contendo 60 mL de meio de cultivo sólido (ágar a 0,6% p/v), o qual consistiu em 0,5X a concentração original de sais MS (MURASHIGUE & SKOOG, 1962) e 2% de sacarose. A esterilização do meio foi realizada por autoclavagem à 121°C por 20 minutos.

Após três meses e meio foram obtidas microestacas apicais de aproximadamente três centímetros, as quais foram utilizadas nos experimentos de enraizamento adventício *in vitro*.

4.2 Experimentos de Enraizamento adventício *in vitro*

O sistema de cultivo consistiu de duas etapas: uma fase inicial de indução, cuja duração foi de até quatro dias (sais MS 0,3X, 0,4 mg/L de tiamina, 100 mg/L inositol, 30 g/L de sacarose, presença ou ausência de 10 mg/L de ácido indol-butírico, com pH ajustado para $5.8 \pm 0,1$) seguida de uma fase de formação, com o mesmo meio de cultivo descrito acima, mas livre de auxina e com adição de 0,1g/L de carvão ativado (FETT-NETO *et al*, 2001).

Os diferentes tratamentos (presença e ausência de auxina) foram submetidos a um fotoperíodo de 16h, intensidade luminosa de aproximadamente $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura média de $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

A esterilização do meio foi realizada por autoclavagem à 121°C por 20 minutos. Os experimentos foram realizados em frascos de vidro de 20 mL contendo 5 mL de meio e densidade de duas microestacas por frasco.

A análise da expressão dos genes selecionados se deu ao longo do tempo de enraizamento, portanto as coletas das microestacas para posterior extração de RNA

foram realizadas depois de 12h, e 1, 2 e 4 dias após inóculo em meio de indução e 1 e 2 dias após transferência para meio de formação, de ambos os tratamentos. As microestacas coletadas foram congeladas em Nitrogênio Líquido e armazenadas a -80°C até o momento da extração. Os experimentos foram realizados em duplicata, utilizando-se seis microestacas para cada ponto de coleta.

4.3 Escolha das sequências e delineamento dos *primers*

Com exceção dos genes *IDH* (Carvalho *et al*, 2008), *RIB*, *EUC12*, *GAPDH* e *SAND* (Bastolla, 2007), os quais já foram utilizados em trabalhos com eucalipto, as sequências representando os possíveis ortólogos aos genes *TIP41* (Czechowski *et al*, 2005; Gutierrez *et al*, 2008), *At4g33380* (Czechowski *et al*, 2005; Gutierrez *et al*, 2008), *TUA* (Brunner *et al*, 2004) e *PUBQ* (Brunner *et al*, 2004) em eucalipto tiveram como base o Banco de dados de *A. thaliana* (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/>). As sequências depositadas neste banco foram submetidas a um *tblastx* contra o Banco de dados do Projeto Genolyptus (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/eucalyptus/>) e a sequência que apresentou maior homologia foi selecionada (Tabela 1).

Os *primers* foram projetados com auxílio do software Oligo PerfectTM Designer (Invitrogen) com as seguintes especificações: tamanho de 20bp, conteúdo de GC de 45 a 55%, T_m de 60°C e *amplicon* de 100 a 150bp (Tabela 2).

Tabela 1. Descrição dos genes candidatos a controle em *Eucalyptus globulus*.

Símbolo do gene	Descrição	Locus homólogo em <i>A. thaliana</i>	EST homóloga em eucalipto (Código Genolyptus)	E-value
EUC12	Suposta proteína de ligação a RNAs	-	-	e-88
Expressa	Proteína expressa de <i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g33380	EUGL-XY-001-052-A11-CN.R	e-47
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase	At1g13440	-	-
IDH	NADP - Isocitrato desidrogenase	-	-	-
PUBQ	Poliubiquitina	At4g05050	EUGL-XY-002-025-H02-CN.R	0,0
RIB	Ribonucleoproteína L23	-	-	-
SAND	Proteína da família SAND de <i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g28390	EUGR-TS-002-009-F11-RS.R	-
TIP41	Proteína semelhante às da família TIP-41 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g34270	EUGR-ML-000-034-E12-BA.R	e-41
TUA1	α -Tubulina	At5g19780	EUGL-XY-002-015-A09-CN.R	e-143

* Os *primers* para EUC12, GAPDH e RIB foram gentilmente cedidos pela equipe do Laboratório de Biologia Molecular Vegetal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O *primer* para IDH foi obtido diretamente de Carvalho *et al* (2008).

Tabela 2. Detalhes dos *primers* para cada um dos genes analisados.

Símbolo do gene	Seqüência dos <i>primers</i>	Tamanho amplicon (bp)	Eficiência
EUC12	F: GCGTGGTTCTTGGATCACTA R: TGGTGACAAAGTCAGGTGCT	114	1,83
Expressa	F: AATATTGGCAGGCAGACCAG R: GTCTAAGCAAGCCTGGCAAC	133	-
IDH	F: CTGTTGAGTCTGGCAAGATGAC R: CATTTAATTCTCCCAACAAA	-	1,89
PUBQ	F: AAGGAATCCACCCTCCACTT R: CCTTGACGTTGTCAATGGTG	124	1,65
SAND	F: CCATTCAACACTCTCCGACA R: TGTGTGACCCAGCAGAGTAAT	143	1,85
TIP41	F: AATGGTTTTTGGCGAGAATG R: TGCAGCAGGAAGCTCAACAG	130	-
TUA	F: AGGCTTACCACGAGCAGCTA R: ATGTACTTTCCGTGCCTTGG	100	1,84

* Os *primers* para EUC12, GAPDH (Eficiência = 1,97) e RIB (Eficiência = 1,98) foram gentilmente cedidos pela equipe do Laboratório de Biologia Molecular Vegetal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O *primer* para IDH foi obtido diretamente de Carvalho *et al* (2008).

4.4 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído utilizando o Kit *NucleoSpin RNA Plant* (Macherey-Nagel) incluindo tratamento com DNase de acordo com as especificações do fabricante. A quantidade de RNA foi obtida por análise no fluorímetro *Qubit™ Quantitation Platform* (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante e a qualidade foi testada em gel de agarose 1%. A primeira fita do cDNA foi sintetizada a partir de 100ng de RNA total utilizando *primer oligo* (*dt*) e transcriptase reversa M-MLV (*Invitrogen*).

4.5 PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT- PCR)

Os cDNAs utilizados foram diluídos 10 vezes em água ultra pura. A análise dos genes selecionados foi realizada no equipamento *StepOne™ Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*) utilizando-se parâmetros de amplificação recomendados pelo

fabricante (5 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 10 segundos e extensão a 72°C por 15 segundos, seguido por uma curva de dissociação - ou de *melting* - de 60 a 90°C, com incremento de 5°C a cada medida de fluorescência). As reações foram realizadas em um volume final de 20µL, sendo que as medidas dos produtos de amplificação se deram através da incorporação do marcador fluorescente *SYBR Green* (*Applied Biosystems*) na dupla fita de cDNA para cada reação de amplificação.

4.6 Análise dos dados

Para a análise de estabilidade no software *geNorm*, os valores de Ct (*Cycle threshold*) foram convertidos em quantidades relativas utilizando a amostra com o menor Ct de cada gene como calibrador e levando em consideração a eficiência média de amplificação de cada par de *primers* na respectiva amostra, a partir da fórmula $Eff^{-\Delta Ct}$ (HELLEMANS *et al.*, 2007), onde *Eff* = eficiência média de amplificação e ΔCt = diferença entre o Ct da amostra e o menor Ct. As eficiências de amplificação foram calculadas com auxílio do software *LinReg PCR*.

A expressão do gene de interesse ao longo do tempo de enraizamento foi analisada em relação ao fator de normalização referente aos dois genes controles mais estáveis (disponibilizado pela análise no *geNorm*) na respectiva amostra.

A comparação dos padrões de expressão do gene de interesse considerando o gene constitutivo com maior ou menor estabilidade foi realizada através do método Ct comparativo já descrito (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

5 RESULTADOS

Neste estudo, a expressão de nove genes considerados constitutivos foi analisada através de qRT-PCR em diferentes amostras de *E. globulus* compreendendo seis estádios diferentes ao longo do enraizamento adventício (12h, dias 1, 2 e 4 da fase de indução e dias 1 e 2 da fase de formação). Os genes escolhidos pertencem a diferentes classes funcionais e incluem uma suposta proteína de ligação a RNAs, uma proteína expressa de *A. thaliana* com função ainda desconhecida, uma proteína semelhante às da família TIP41, uma proteína da família SAND, ribonucleoproteína L23, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, NADP Isocitrato desidrogenase, tubulina e ubiquitina (Tabela 1).

Os *primers* para os genes At4g33380 (Proteína expressa de *A. thaliana*) e TIP41, envolvido com a regulação negativa da via de sinalização da proteína TOR (*Target Of Rapamycin*), uma quinase que controla o crescimento celular em resposta a diferentes nutrientes (JACINTO *et al*, 2001), não permitiram a amplificação de nenhum produto com os cDNAs testados e foram eliminados das análises. Todos os outros pares de *primers* permitiram a amplificação de produtos específicos, o que foi confirmado pela presença de apenas um pico nas curvas de dissociação (Anexo 1). As eficiências de amplificação variaram de 1,65 para PUBQ a 1,98 para RIB (Tabela 2).

Os sete genes restantes tiveram sua estabilidade de expressão (M) analisada através do software *geNorm*. Esta ferramenta utiliza o princípio de que a razão da expressão de dois genes referência perfeitos deve ser constante através de diferentes condições experimentais e/ou tipos celulares. O valor de M é definido como a variação média de um certo gene em relação a todos os outros testados. Os valores médios de M para cada um dos sete genes analisados estão mostrados na figura 1. O gene com o menor valor de M é considerado o mais estável, enquanto aquele que apresentar o maior valor é considerado como tendo maior variabilidade de expressão nas condições testadas. Os resultados indicaram IDH e EUC12 (M=0,497) como os genes mais estáveis e GAPDH (M=1,293) como o mais variável, sendo que IDH, EUC12 e SAND se mantiveram bem abaixo do valor máximo proposto de M<1,0 (HELLEMANS *et al*, 2007). Embora alguns autores concordem com a utilização de apenas um gene como controle

(BRUNNER *et al*, 2004; CZECHOWSKI *et al*, 2005; GUTIERREZ *et al*, 2008), alguns estudos sugerem a utilização de dois ou mais genes para normalização dos dados por acreditarem que isto resultaria em interpretações mais consistentes dos resultados (VANDESOMPELE *et al*, 2002; NICOT *et al*, 2005; EXPÓSITO-RODRIGUEZ *et al*, 2008; TONG *et al*, 2009). Neste âmbito, foi realizada uma análise do número ótimo de genes necessários para a normalização acurada dos dados (Figura 2). Considerando um *cut-off* de 0,15 como proposto pelo software *geNorm*, a utilização de dois genes ainda não seria suficiente para uma normalização perfeita. Entretanto, os resultados da figura 2 mostram que a adição subsequente de outros genes acabaria prejudicando a análise. Sendo assim, *IDH* e *EUC12* foram considerados suficientes para normalização dos dados.

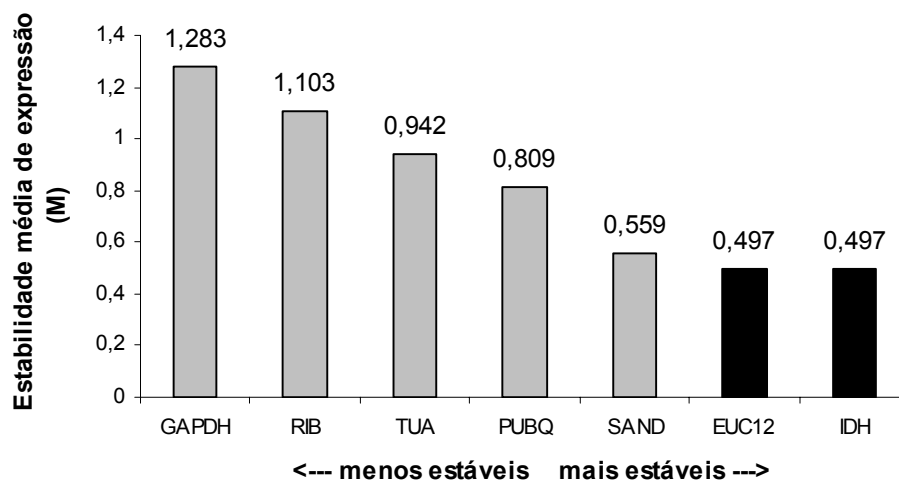


Figura 1. Estabilidade média de expressão (M) de acordo com o software *geNorm* de sete genes ditos constitutivos analisados por qRT-PCR em microestacas de *E. globulus* submetidas a tratamento com ou sem 10mg/L AIB (Ácido Indol Butírico) na fase de indução. As amostras se referem a microestacas coletadas ao longo do tempo de enraizamento. Valor de M ideal <1,0 (HELLEMANS *et al*, 2007). Barras pretas indicam os genes mais estáveis dentre os testados.

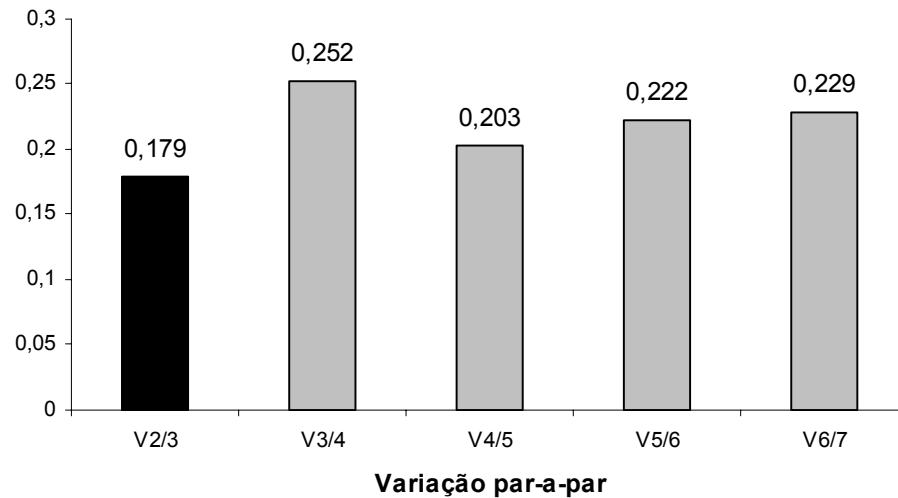


Figura 2. Determinação do número ótimo de genes para normalização. Cálculo a partir do software *geNorm*. *Cut-off* ideal <0,15 (VANDESOMPELE *et al*, 2002). Barra preta indica número ótimo de genes para normalização.

A determinação de um gene referência adequado para estudos de expressão gênica é o primeiro passo que permite a análise do padrão de expressão relativa de genes de interesse em um dado experimento ou etapa de desenvolvimento. A presença de um gene com padrão confirmadamente constitutivo confere um caráter mais confiável aos resultados. Considerando seu papel na sinalização de auxina, a expressão ao longo do tempo de enraizamento de um ortólogo ao gene *AGO1* de *A. thaliana* em *E. globulus* foi investigada.

O padrão de expressão de *AGO1* mostrou-se basal nos estádios iniciais do enraizamento adventício, com uma leve tendência de aumento no segundo dia da fase de indução em plantas sob ação de auxina exógena. Um aumento significativo no primeiro dia da fase de formação também foi observado em plantas com aporte exógeno de auxina (Figura 3). Este resultado pode indicar a ação de *AGO1* na regulação de *ARF17*, inibindo sua ação e promovendo resposta à auxina, uma vez que, neste período, sinais de primórdios radiculares começam a surgir na base da estaca (dados não mostrados).

Para mostrar a importância da escolha correta do gene controle, a expressão de *AGO1* foi analisada também em relação à expressão de *GAPDH*, o gene cuja expressão foi mais variável de acordo com as análises pelo *geNorm*. A figura 4 mostra a comparação do padrão de expressão de *AGO1* em relação aos genes *IDH* e *GAPDH*, mostrando algumas variações significativas nos padrões de expressão, principalmente nos estádios iniciais (12h) e primeiro e segundo dias da fase de formação das plantas controle (sem aporte de auxina exógena). *IDH* foi escolhido para representar o melhor gene controle em detrimento de *EUC12* por estar presente entre os melhores mesmo em análises utilizando diferentes lotes de cDNA, o que não aconteceu com *EUC12* (dados não mostrados), sugerindo uma possível maior estabilidade de *IDH* em relação a *EUC12*.

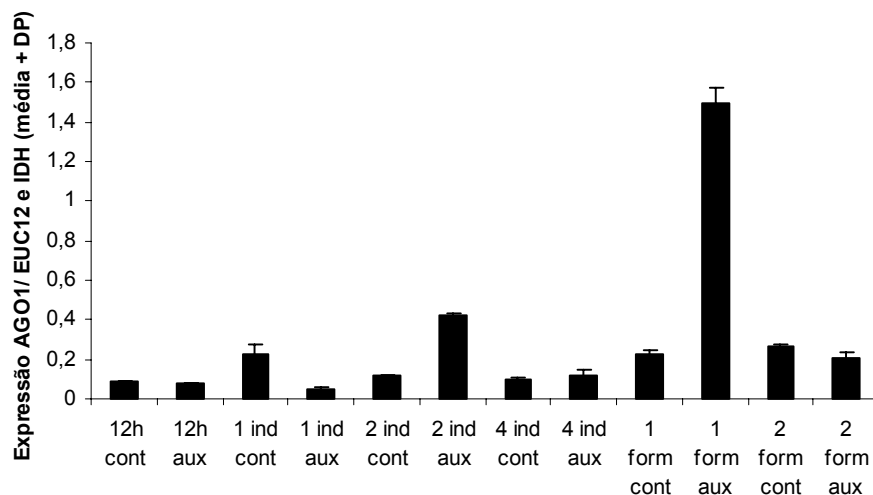


Figura 3. Padrão de expressão de um provável ortólogo ao gene *Argonaute 1* (*AGO1*) de *Arabidopsis thaliana* em *Eucalyptus globulus* ao longo do tempo de enraizamento em relação ao fator de normalização referente aos genes constitutivos *EUC12* e *NADP Isocitrato desidrogenase* (*IDH*) – resultante da análise no *geNorm*. Barras indicam média + Desvio Padrão (DP). "aux" indica presença de 10mg/L de Ácido Indol Butírico (AIB) durante a fase de indução e "cont" indica ausência da mesma.

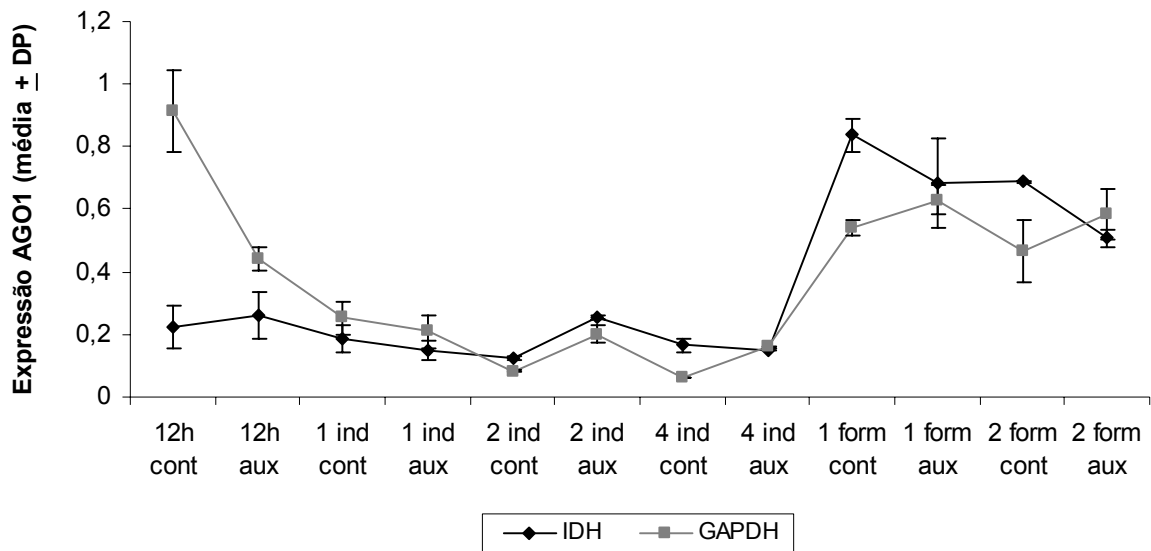


Figura 4. Padrão de expressão de um provável ortólogo ao gene *Argonaute 1* (*AGO1*) de *Arabidopsis thaliana* em *Eucalyptus globulus* ao longo do tempo de enraizamento. Linhas pretas indicam padrão de expressão de *AGO1* em relação ao gene referência *NADP Isocitrato desidrogenase* (*IDH*) e linhas cinza indicam padrão de expressão de *AGO1* em relação ao gene referência *Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* (*GAPDH*). "aux" indica presença de 10mg/L de Ácido Indol Butírico (AIB) durante a fase de indução e "cont" indica ausência da mesma. Cálculos a partir do método de Ct comparativo (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

6 DISCUSSÃO

No campo da análise da expressão gênica, o qRT-PCR tem se tornado o principal método de escolha para a investigação do perfil de expressão de um gene por se mostrar o mais sensível até o momento (GACHON *et al*, 2004). Neste sentido, uma correta normalização torna-se pré-requisito para a confiabilidade dos resultados, especialmente na verificação da relevância biológica de pequenas diferenças ou no estudo de amostras de diferentes tecidos ou órgãos (EXPÓSITO-RODRIGUES *et al*, 2008; GUÉNIN *et al*, 2008; GUTIERREZ *et al*, 2008). Vários genes são tradicionalmente conhecidos como constitutivos ou *housekeeping genes*, sendo amplamente utilizados. Entretanto, mesmo genes envolvidos em processos celulares básicos podem apresentar variações significativas de expressão, não sendo apropriados para utilização com controles internos em determinadas situações (CZECHOWSKI *et al*, 2005; BASTOLLA, 2007; GUÉNIN *et al*, 2008; GUTIERREZ *et al*, 2008).

No presente trabalho, sete genes tiveram seus padrões de expressão analisados ao longo do tempo de enraizamento adventício em microestacas de *E. globulus in vitro*. Dentre este conjunto de genes, cinco pertencem ao grupo dos tradicionalmente utilizados como controles e dois são possíveis novos genes constitutivos. Entre os tradicionais estão *GAPDH*, *IDH*, *PUBQ*, *RIB* e *TUA*, genes bastante conhecidos e com funções bem descritas na literatura, exceto *RIB* (ribonucleoproteína L23), uma proteína ribossomal pertence à subunidade grande do ribossomo a qual se liga a uma região específica no rRNA 23S (MRUSEK *et al*, 2005), porém ainda não possui uma função determinada em plantas.

GAPDH demonstrou o padrão de expressão mais variável (Figura 1), corroborando dados de Expósito-Rodríguez *et al* (2008) em estudo com tomate, em que *GAPDH* se mostrou o terceiro gene mais variável dentre onze testados. Em contrapartida, Vandesompele *et al* (2002) encontrou *GAPDH* como um dos genes mais estáveis, porém em amostras de tecidos humanos. Embora este gene codifique uma enzima extremamente importante para todos os eucariotos, sua regulação em plantas e animais deve ser bastante diferente. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é uma enzima chave na glicólise, convertendo gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato

com a concomitante redução de NAD^+ a NADH . Em plantas, a glicólise ocorre tanto no citosol como nos plastídeos e é um processo fundamental na geração do ATP (MUÑOZ-BERTOMEU *et al*, 2009). Este mesmo autor demonstrou que a deficiência da enzima GAPDH plastidial leva a um desenvolvimento radicular alterado, além de afetar o balanço de açúcares e aminoácidos em *A. thaliana*. Entretanto, um aumento na expressão de GAPDH tanto citosólica como plastidial pode estar envolvido com a supressão de espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas devido à ocorrência de estresse oxidativo. Mutantes nulos para GAPDH citosólica demonstraram um aumento no acúmulo de EROs.

RIB, *TUA* e *PUBQ* também demonstraram variabilidade de expressão (Figura 1), apresentando valores de *M* maiores que 0,8. Embora o valor máximo indicado pelo software seja $M < 1,0$, estudos recentes apontam $M < 0,5$ como valores mais adequados (GUTIERREZ *et al*, 2008). Além disso, com exceção de *RIB*, *TUA* e *PUBQ* apresentaram valores médios de *Ct* extremamente altos (acima de 30), o que indicaria baixo padrão de expressão (dados não mostrados). Entretanto, amostras com *Ct* acima de 30 podem levar a erros de interpretação em qRT-PCR, pois a análise passa a se dar na fase de *plateau* de amplificação, ou seja, em que o aumento de cópias do fragmento de DNA já não é mais linear, sendo que para condições ideais a análise deve ocorrer durante a fase exponencial de amplificação. Considerando as funções de ambos os genes, sendo *TUB* envolvido na formação dos microtúbulos e *PUBQ* envolvido em complexos de degradação de proteínas, é provável que tenha havido algum problema na confecção dos *primers*. Sendo assim, novos *primers* devem ser projetados para verificar se este padrão se repete.

A tubulina, uma proteína heterodimérica composta por duas subunidades altamente conservadas, α e β (WHITTAKER *et al*, 1999), é o principal componente estrutural dos microtúbulos, componentes dos filamentos de citoesqueleto de células eucaróticas. Os microtúbulos desempenham papel central em vários processos básicos como divisão celular, transporte intracelular, movimento celular, morfogênese e manutenção do formato da célula (LUDWIG *et al*, 1987; WHITTAKER *et al*, 1999). Em células vegetais, a formação da parede celular e a divisão das células da parede requerem a ação de microtúbulos específicos como os microtúbulos corticais,

envolvidos na orientação das microfibrilas de celulose; a banda de pré-prófase, a qual delinea o plano de divisão da célula; e o fragmoplasto, o qual se forma no plano equatorial para formação da nova parede celular (LUDWIG *et al*, 1987). Embora envolvida em processos celulares essenciais, TUA pode não apresentar um padrão constitutivo em todas as espécies. De acordo com o resultado do presente trabalho, Expósito-Rodríguez *et al* (2008) encontrou este gene como o mais instável em estudo com diferentes órgãos e estádios de desenvolvimento em tomate. Entretanto, Brunner *et al* (2004), em estudo com *Populus*, obteve bons resultados com TUA, apresentando este gene dentre os três mais estáveis da análise.

Poliubiquitinas são uma classe das ubiquitinas, proteínas altamente conservadas nos eucariotos e que estão envolvidas em complexos de sinalização para degradação de outras proteínas (SUN *et al*, 1997), além de participarem do controle da tradução, reparo de DNA, regulação da endocitose e tráfego de proteínas (HERNANDEZ-GARCIA *et al*, 2009). Genes codificando poliubiquitinas possuem repetições *em tandem* tipo cabeça-cauda de 228 bp codificando a proteína ubiquitina. Nas plantas superiores, os transcritos de ubiquitinas são abundantes em tecidos meristemáticos, porém estão em menores concentrações em órgãos maduros. Em contraste, transcritos de poliubiquitinas são detectados igualmente em ambos os tipos de tecidos (SUN *et al*, 1997).

IDH, juntamente com *EUC12*, apresentou o menor valor de *M* e, conseqüentemente, o padrão de expressão mais estável (Figura1). Isto pode se dever ao fato de *NADP Isocitrato desidrogenase* codificar uma enzima relacionada com metabolismo de carboidratos, processo de extrema importância e necessário em todas as fases de desenvolvimento das plantas, sendo responsável pela conversão de isocitrato a 2-oxoglutarato de forma NADP dependente. Esta enzima pertence a uma família multienzimática cujos membros são bem distribuídos em todos os organismos vivos e está localizada em diferentes compartimentos, como citosol, mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (MATEOS *et al*, 2009). A síntese de 2-oxoglutarato proporciona uma ligação entre o metabolismo de carbono e nitrogênio nas plantas. Este oxoácido é o esqueleto de carbono primário para a assimilação do nitrogênio inorgânico em aminoácidos através do ciclo glutamina-sintetase/glutamato-sintetase. Em plantas

herbáceas, a NADP-IDH citosólica está envolvida com metabolismo de nitrogênio, porém em plantas lenhosas ainda não se tem muita informação sobre sua função no desenvolvimento. Sua presença em tecidos vasculares pode indicar um possível papel na recuperação da amônia liberada pela lignificação das células ou no catabolismo de asparagina, presente durante a lignificação de hipocótilos em pinheiros (revisado em PASCUAL et al, 2008). Embora considerada uma “housekeeping enzyme”, NADP-IDH não parece ser adequada para utilização como controles em frutos, devido ao seu possível papel na maturação (MATEOS et al, 2009).

Os genes pertencentes à classe de potenciais novos constitutivos escolhidos para este estudo foram *EUC12* e *SAND*. *EUC12* codifica uma suposta proteína de ligação a RNAs determinada em um estudo com eucalipto desenvolvido por Bastolla (2007) utilizando microarranjos. Entretanto, sua função ainda não foi elucidada. A família *SAND* inclui proteínas altamente conservadas em todos os eucariotos e que estão envolvidas com transporte vesicular intracelular, sendo requeridas em praticamente todas as vias de tráfego entre membranas em que o vacúolo é o compartimento acceptor final (POTERYAEV et al, 2005). Em plantas atuam na biogênese e sinalização de vacúolos (COTTAGE et al, 2001). Czechowski et al (2005) recomendou este gene como um bom normalizador após um estudo pioneiro acerca de genes constitutivos em *A. thaliana*. Bastolla (2007) o recomendou como bom normalizador para amostras de folhas e xilema de *E. grandis* e *E. globulus* crescidos a campo e Remans et al (2008) encontrou alta estabilidade de expressão deste gene em estudos com *A. thaliana* submetidas a excesso de Cádmio e Cobre.

Com o objetivo de validar *IDH* e *EUC12* como genes normalizadores para *E. globulus* durante a rizogênese adventícia *in vitro*, o perfil de expressão de um gene relacionado com ação de auxina foi investigado, utilizando *IDH* e *EUC12* como controles (Figura 3). *AGO1* se manteve basal durante toda a fase de indução de enraizamento, tanto nas plantas controle como nas submetidas a tratamento com auxina exógena. Considerando o fato de que, em *E. globulus*, mesmo plantas submetidas a um aporte exógeno de auxina não apresentam nenhum sinal de enraizamento adventício durante a fase de indução, este fenótipo corrobora com o encontrado em mutantes nulos *ago1* de *A. thaliana*, os quais apresentaram quantidades

de raízes adventícias significativamente menores do que as plantas selvagens (SORIN *et al*, 2005), podendo estar relacionado à ação repressora de *ARF17*. Nas plantas controle, este padrão basal se mantém também ao longo da fase de formação, sendo que, nestas plantas, de acordo com resultados anteriores (não publicados) dificilmente há a formação de raízes adventícias mesmo após 20 dias em meio de enraizamento. Por outro lado, nas plantas tratadas com auxina, ocorreu um aumento significativo na expressão de *AGO1* no primeiro dia da fase de formação. Considerando que nestas plantas as raízes adventícias começam a emergir na base das estacas normalmente a partir do segundo dia da fase de formação, é possível que a ação de *AGO1* seja necessária justamente no primeiro dia desta fase, promovendo a repressão de *ARF17* e permitindo que fatores de transcrição com ação ativadora possam atuar de forma a promover a ocorrência das respostas à auxina. No segundo dia da fase de formação, a ação de *AGO1* parece não ser mais necessária e ele passa a mostrar novamente um padrão basal de expressão.

A expressão de *AGO1* também foi analisada em relação à *GAPDH*, gene referência cuja expressão se mostrou mais variável, com o objetivo de se fazer uma comparação com o padrão de expressão de *AGO1* relativo à *IDH*. *IDH* foi escolhido para representar o gene mais estável por apresentar alta estabilidade mesmo em análises utilizando lotes diferentes de cDNA ao contrário de *EUC12*, o qual apresentou uma certa variação em análises anteriores (dados não mostrados). Este resultado pode se dever a uma possível superioridade de *IDH* em relação a *EUC12* quanto à estabilidade de expressão.

Os resultados demonstraram padrões diferentes, mostrando variações significativas durante o estágio inicial de indução do enraizamento adventício (12h) de ambas as plantas controle e submetidas a tratamento com auxina exógena. Nestes pontos, a expressão de *AGO1* parece ser induzida ao se considerar *GAPDH* como gene controle, ao contrário do padrão de *AGO1* em relação à *IDH*, o qual se mantém basal durante toda a fase de indução (Figura 4). Essas diferenças chegam à ordem de 8x para as plantas controle e 3x para as plantas tratadas com auxina. Considerando *GAPDH* como gene controle, a expressão de *AGO1* parece ser fortemente induzida no início da fase de indução, sofrendo uma diminuição ao longo desta fase, sendo

novamente induzida, porém em menor grau, na fase de formação, o que demonstraria um padrão inesperado de expressão para este gene considerando sua ação na regulação dos *ARFs*.

Estes resultados confirmam a importância de uma escolha correta do gene constitutivo para análises de expressão de transcritos por qRT-PCR. Interpretações errôneas e inconsistentes podem ser levadas adiante se uma validação prévia de genes-referência não for realizada para as condições experimentais do estudo (GUTIERREZ *et al*, 2008; GUÉNIN *et al*, 2009).

7 CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS

A análise de genes referência para estudos de expressão gênica em *E. globulus in vitro* indicou *IDH* e *EUC12* como os genes constitutivos mais adequados para estudos durante a rizogênese adventícia nesta espécie. Novas análises são necessárias para verificar se este resultado se mantém em outras espécies de eucalipto. O padrão de expressão de um possível ortólogo ao gene *AGO1* de *Arabidopsis thaliana* em *Eucalyptus globulus* se mostrou consistente com sua ação já descrita na primeira espécie. Entretanto, o sequenciamento do fragmento amplificado nas reações de qRT-PCR ainda precisa ser realizado para confirmação da identidade da sequência. Diferenças significativas foram encontradas no padrão de expressão de *AGO1* utilizando genes constitutivos diferentes quanto à estabilidade, o que confirma a importância do gene controle na interpretação de dados relativos à expressão gênica. Desta forma, este trabalho poderá tornar-se ponto de partida para estudos moleculares posteriores em *E. globulus in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anuário Estatístico da ABRAF - Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas, 2009.

BASTOLLA, Fernanda. **Seleção e avaliação de genes de referência para estudos de expressão gênica em *Eucalyptus***. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

BRUNNER, A., M., YAKOVLEV, I., A. & STRAUSS, S., H. **Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies**. BMC Plant Biology 4:14, 2004.

BUTLER, E.D. & GALLAGHER, T.F. **Gene note – Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel 2-oxoacid-dependent dioxygenase which is up-regulated during adventitious root formation in apple (*Malus domestica* ‘Jork 9’) stem discs**. J. Exp.Bot. 50(333):551-552, 1999.

CARVALHO, M., C., C., G.; CALDAS D., G., G.; CARNEIRO, R., T.; MOON, D., H.; SALVATIERRA, G., R.; FRANCESCHINI, L., M.; ANDRADE, A.; CELEDON, P., A., F.; ODA, S. & LABATE C., A. **SAGE transcript profiling of the juvenile cambial region of *Eucalyptus grandis***. Tree Physiology 28, 905–919, 2008.

COTTAGE, A., EDWARDS, Y. J. K. & ELGAR, G. **SAND, a new protein family: from nucleic acid to protein structure and function prediction**. Comp. Funct. Genom 2: 226-235, 2001.

CZECHOWSKI, T., STIIT, M, ALTMANN, T., UDVARDI, M. K. & SCHEIBLE, W. **Genome-wide identification and testing of superior reference-genes for transcript normalization in *Arabidopsis***. Plant Physiology 139: 5-17, 2005.

DE KLERK, G.J., VAN DER KRIEKEN W. & DE JONG J.C. **The formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities**. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. 35(3): 189-199 MAY-JUN, 1999.

DHARMASIRI, N.; DHARMASIRI, S.; ESTELLE, M. **The F-box protein TIR1 is an auxin receptor**. Nature 435: 441-445, 2005.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo, Edgard Blücher, Ed. da Universidade de São Paulo, 1974.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M., BORGES, A. A., BORGES-PÉREZ, A. & PÉREZ, J. A. **Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process**. BMC Plant Biology 8:131, 2008.

Food and Agriculture Organization – Forestry Department, 2005.

FETT-NETO, A.G., FETT, J.P., GOULART, L.W.V., PASQUALI, G., TERMIGNONI, R.R. & FERREIRA, A.G. **Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*.** *Tree Physiology*. 21: 457-464, 2001.

FOGAÇA, C.M. **Papel de Auxinas e seus Moduladores na Rizogênese de *Eucalyptus globulus* Labill e *Eucalyptus saligna* Smith.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Botânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brasil. 2003.

FOGAÇA, C.M.; FETT-NETO, A.G. **Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of *Eucalyptus* species differing in recalcitrance.** *Plant Growth Regulation* 45: 1-10, 2005.

GACHON, C., MINGAM, A., CHARRIER, B. **Real time PCR: what relevance to plant studies?** *Journal of Experimental Botany*, 55 (402): 1445-1454, 2004.

GEISLER, M. & MURPHY, A. **The ABC of auxin transport: The role of p-glicoproteins in plant development.** *FEBS Letters*, 580: 1094-1102, 2006.

GUÉNIN, S., MAURIAT, M., PELLOUX, J., VAN WUYTSWINKEL, O., BELLINI, C. & GUTIERREZ, L. **Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references.** *Journal of Experimental Botany* 60 (2): 487-493, 2009.

GUTIERREZ, L., MAURIAT, M., GUÉNIN, S., PELLOUX, J., LEFEBVRE, J., LOUVET, R., RUSTERUCCI, C., MORITZ, T., GUERINEAU, F., BELLINI, C. & 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 Biotechnology Journal* 6: 609-618, 2008.

HAND, P. **Biochemical and molecular markers of cellular competence for adventitious rooting.** In *Biology of adventitious root formation*. Eds. T.D. Davis and Haissig, B.E. *Basic Life Sciences* 62. Plenum Press. New York. pp 111- 121, 1994.

HARTMANN, H.T., KESTER D.E. & DAVIES, F.T. **Plant propagation: principles and practices.** Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall. 1990.

HELLEMANS., J; MORTIER., G; DE PAEPE., A; SPELEMAN., F & VANDESOMPELE., J. **qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data.** *Genome Biology* 8:R19, 2007.

HERNANDEZ-GARCIA, C. M., MARTINELLI, A. P. BOUCHARD, R. A. & FINER, J. J. **A soybean (*Glycine max*) polyubiquitin promoter gives strong constitutive expression in transgenic soybean.** *Plant Cell Rep* 28:837–849, 2009.

- JACINTO, E; GUO, B; ARNDT, K. T.; SCHMELZLE, T. & HALL, M. N. **TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway.** *Molecular Cell* 8: 1017-1026, 2001.
- JAIN, M.; KAUR, N.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. **The auxin-responsive GH3 gene family in rice (*Oryza sativa*).** *Funct Integr Genomics* 6: 36-46, 2006.
- LE ROUX, J.J. & VAN STADEN, J. **Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus* – a review.** *Tree Physiol.* 9: 435-477, 1991.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method.** *Methods* 25: 402–408, 2001.
- LUDWIG, S. R.; OPPENHEIMER, D. G., SILFLOW, C. D. & SNUSTAD, D. P. **Characterization of the α-tubulin gene family of *Arabidopsis thaliana*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Genetics* 84: 5833-5837, 1987.
- MALLORY, A. C.; BARTEL, D., P. & BARTEL, B. **MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes.** *The Plant Cell* 17: 1360–1375, 2005.
- MATEOS, R. M.; BONILLA-VALVERDE, D.; DEL RÍO, L. A.; PALMA, J. M. & CORPAS, F. J. **NADP-dehydrogenases from pepper fruits: effect of maturation.** *Physiologia Plantarum* 135: 130–139, 2009.
- MORA A.L. & GARCIA C.H. **A Cultura do Eucalipto no Brasil.** 112 p. SBS, São Paulo, 2000.
- MRUSEK, S.; CLASSEN-LINKE, I.; VLOET, A.; BEIER, H. M. & KRUSCHE, C. A. **Estradiol and medroxyprogesterone acetate regulated genes in T47D breast cancer cells.** *Molecular and Cellular Endocrinology* 235: 39-50, 2005.
- MUDAY, G.K.; DELONG, A. **Polar auxin transport: controlling where and how much.** *Trends in Plant Science* 6: 535-542, 2001.
- MUÑOZ-BERTOMEU, J., CASCALES-MIÑANA, B., MULET, J. M., BAROJA-FERNÁNDEZ, E., POZUETA-ROMERO, J., KUHN, J. M., SEGURA, J. & ROS, R. **Plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deficiency leads to altered root development and affects the sugar and amino acid balance in *Arabidopsis*.** *Physiol. Plant. Preview*, 2009.
- MURASHIGUE, T. & SKOOG, F. **A revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Cultures.** *Physiol. Plant.* 15: 473-498, 1962.

- NICOT, N., HAUSMAN, J., HOFFMAN, L & EVERS, D. **Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress.** *Journal of Experimental Botany* 56 (421): 2907-2914, 2005.
- PASCUAL, M. B.; MOLINA-RUEDA, J. J.; CÁNOVAS, F. M. & GALLARDO, F. **Spatial distribution of cytosolic NADP⁺-isocitrate dehydrogenase in pine embryos and seedlings.** *Tree Physiology* 28: 1773–1782, 2008.
- POKE, F. S., VAILLANCOURT, R. E., POTTS, B. M., REID, J. B. **Genomic research in *Eucalyptus*.** *Genetica* 125: 79-101, 2005.
- POTERYAEV, D. & SPANG, A. **A role of SAND-family proteins in endocytosis.** *Biochemical Society Transactions* 33, part 4, 2005.
- REMANS, T.; SMEETS, K.; OPDENAKKER, K.; MATHIJSEN, D.; VANGRONVELD, J. & CUYPERS, A. **Normalization of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations.** *Planta* 227: 1343-1349, 2008.
- SERRANO, L., ROCHANGE, F., SEMBLANT, J.P., MARQUE, C., TEULIÈRES, C. & BOUDET A.M. **Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biolistics: complementary development of procedures for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferating tissue.** *J. Exp. Bot.* 45: 285-290, 1996.
- SORIN, C., BUSSELL, J. D., CAMUS, I., LJUNG, K., KOWALCZYK, M., GEISS, G., MCKHANN, H., GARCION, C., VAUCHERET, H., SANDBERG, G., BELLINI, C. **Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1.** *The Plant Cell*, 17: 1343-1359, 2005.
- SOUZA, V. C. & LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II.** 2ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.
- STRADER, L. C., MONROE-AUGUSTUS, M., BARTEL, B. **The IBR5 phosphatase promotes *Arabidopsis* auxin responses through a novel mechanism distinct from TIR1-mediated repressor degradation.** *BMC Plant Biology* 8:41, 2008.
- SUN, C.; GRIFFEN, S. & CALLIS, J. **A model for the evolution of polyubiquitin genes from the study of *Arabidopsis thaliana* ecotypes.** *Plant Molecular Biology* 34: 745–758, 1997.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 4ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2009.
- TONG, Z., GAO, Z., WANG, F., ZHOU, J. & ZHANG, Z. **Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR.** *BMC Molecular Biology* 10:71, 2009.

VAN DER KRIEKEN, W.M., BRETELER, H., VISSER, M.H.M. & MAVRIDOU, D. **The role of the conversion of IBA into IAA on root regeneration in apple: introduction of a test system.** Plant Cell Rep. 12: 203-206, 1993.

VANDESOMPELE, J., De PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., De PAEPE, A. & SPELEMAN, F. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** Genome Biology 3:7, 2002.

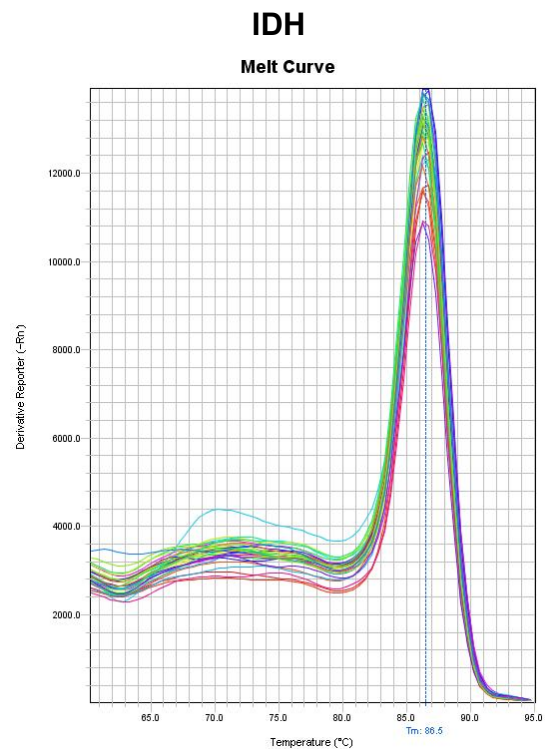
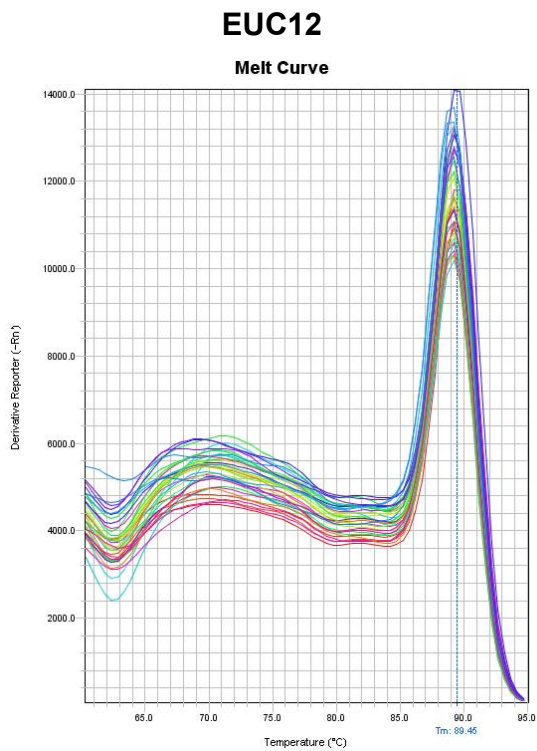
VITAL, M. H. F. **Impacto ambiental de florestas de eucalipto.** Revista do BNDES, Rio de Janeiro, V. 14, N. 28, P. 235-276, dez. 2007.

WHITTAKER, D. J. & TRIPLETT, B. A. **Gene-Specific Changes in α -Tubulin Transcript Accumulation in Developing Cotton Fibers.** Plant Physiology: 121, 181–188, 1999.

WOODWARD, A.W. & BARTEL B. **A receptor for auxin.** Plant Cell, 17: 2425-2429, 2005.

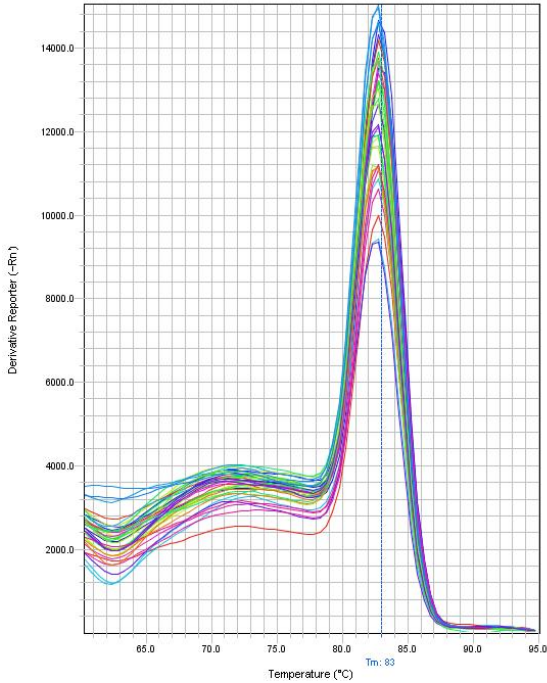
ANEXOS

Anexo 1 – Curvas de dissociação (*Melting curves*) referentes ao genes-referência utilizados no presente trabalho.



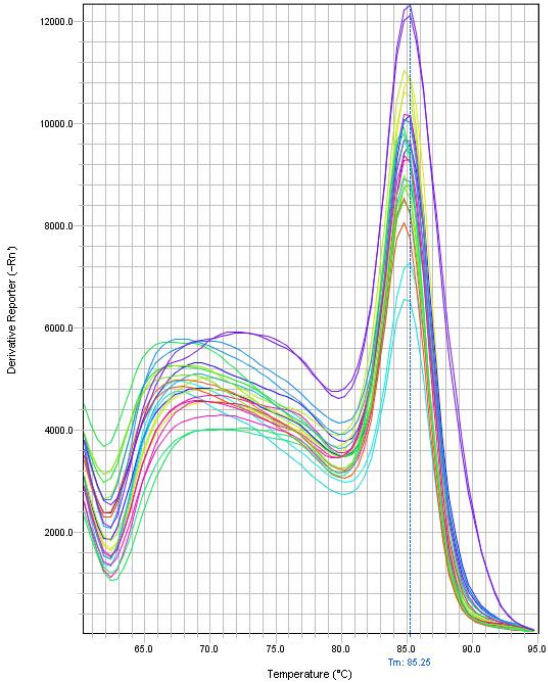
SAND

Melt Curve



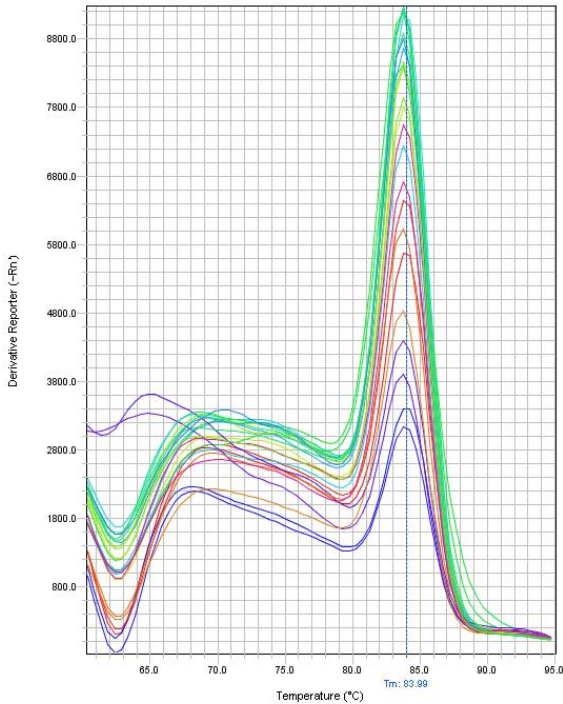
PUBQ

Melt Curve



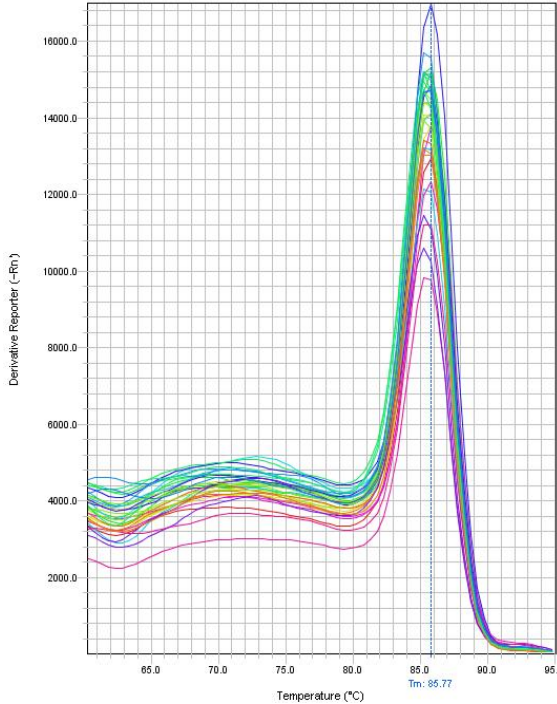
TUA

Melt Curve



RIB

Melt Curve



GAPDH Melt Curve

