

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs DURANTE O DESENVOLVIMENTO
DE SEMENTES DE *BRASSICA NAPUS* E PREDIÇÃO DE SEUS POSSÍVEIS
GENES ALVOS**

Ronei Dorneles Machado

Porto Alegre, RS, Brasil

Junho, 2013

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs DURANTE O DESENVOLVIMENTO
DE SEMENTES DE *BRASSICA NAPUS* E PREDIÇÃO DE SEUS POSSÍVEIS
GENES ALVOS**

Ronei Dorneles Machado

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Márcia Margis

Co-orientador: Rogério Margis

Porto Alegre, RS, Brasil

Junho de 2013

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Esta dissertação foi desenvolvida no Núcleo de Genômica Funcional de Plantas Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), e no Laboratório de Genomas e Populações de Plantas do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação da Dra. Marcia Pinheiro Margis e co-orientação do Dr. Rogério Margis.

O trabalho faz parte do Projeto Estruturante de Agroenergia do Estado do Rio Grande do Sul sendo subvencionado pela FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) e pela FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul).

AGRADECIMENTOS

- Aos pesquisadores da banca examinadora, pela disponibilidade.
- A Dra. Marcia Margis e ao Dr. Rogério Margis, pelas orientações e pela oportunidade de participar de seus grupos de pesquisa.
- A Dra. (Pós-doc) Ana Paula Korbes pela incansável ajuda e aprendizado durante todo o período do mestrado.
- Ao PPGBCM e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Ao CNPq pela concessão da bolsa de Apoio Técnico.
- A Silvia e ao Luciano, pela sua eficiência e boa vontade em ajudar e facilitar a vida dos alunos do PPGBM.
- Aos colegas e amigos do NGFP – Núcleo de Genômica Funcional de Plantas em especial, Rafael Arenhart, Lauro Bucker Neto, Alexandro Cagliari.
- Aos colegas e amigos do LGPP – Laboratório de Genomas e Populações de plantas
- Ao grupo do Metabolismo lipídico pelas excelentes reuniões e discussões no decorrer deste trabalho.
- Aos meus irmãos Rubinei e Leticia e sobrinho Caio por todos estes anos de convivência e apoio na pesquisa.
- Aos meus pais, Rubinei e Maria Cecília, por me apoiarem em todos os momentos da vida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMO	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 A espécie <i>Brassica napus</i> e a canola cultivada.....	12
1.2 Desenvolvimento de sementes e acúmulo de compostos de reserva.....	13
1.3 Aspectos moleculares do desenvolvimento de sementes	16
1.4 MicroRNAs.....	18
1.5 Atuação dos microRNAs no desenvolvimento de sementes	22
1.6 PCR Quantitativo em Tempo Real e Genes-Referência	24
2. OBJETIVO	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
CAPÍTULO I- Seleção de genes de referência para a quantificação relativa de miRNAs durante desenvolvimento de sementes em <i>B.napus</i>	28
CAPÍTULO II - Expressão de microRNAs durante o desenvolvimento de sementes de <i>Brassica napus</i> e predição de possíveis genes alvos envolvidos no metabolismo lipídico	53
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
4. Referências Bibliográficas da Introdução e Considerações Finais.....	89
5. ANEXO	97

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA- ácido abscísico

ABI3- ABSCISIC ACID INSENSITIVE3

AGO- Argonauta, proteína envolvida na RNAi, presente no complexo RISC, com atividade de RNase e/ou ligação de RNAs

AP2- APETALA2

ASIL1- Arabidopsis 6 B-Interacting Protein -Like1

BCCP2- Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase 2

BLAST- “Basic Local Alignment Search Tool”,

Blastx- Algoritmo da ferramenta BLAST que inspeciona um banco de dados de sequências codificantes, utilizando sequências peptídicas como isca.

bZIP- domínio dedo de zinco de ligação ao DNA

CBF- “CCAAT-Binding Factor, subunit ”

cDNA- DNA complementar

DCL- Proteína envolvida na RNAi, com atividade de RNase e/ou ligação de dsRNAs do tipo “dicer”; do inglês, “Dicer-Like”

dsRNA- RNA de dupla fita, do inglês, “double strand RNA”

ESTs - Sequências expressas obtidas de cDNAs; do inglês, “Expressed Sequence Tags”

FUS3 (FUSCA3)- Fator de transcrição com domínio B3

HEN- ativador de HUA (ativador de agamous); do inglês, “HUA Enhancer”

HST- HASTY- transportador de membrana de pequenos RNAs

HYL1- HYPONASTIC LEAVES1, proteína ligante de dsRNA

KAS1- 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I

LEC1- LEAFY COTYLEDON 1

LEC2- LEAFY COTYLEDON 2

miRNA- microRNA

NF-YA- Do inglês, “Nuclear Factor Y Alpha-related”

nt- nucleotídeo

PCR- Reação em cadeia da polimerase, do inglês, “polymerase chain reaction”

PKp- β 1-Polipeptideo sintase

Pre-miRNA- Precursor de miRNA

PTGS- Silenciamento gênico pós-transcricional, do inglês, “Post-transcriptional gene silencing”

RACE- Do inglês, “Rapid amplification of cDNA ends”

RISC- Complexo indutor do silenciamento por RNA, do inglês, “RNA-Induced Silencing Complex”

RNA Pol- RNA polimerase

RNAi- RNA de interferência

RNAPol II- RNA polimerase II

RT- Transcriptase reversa; do inglês, “Reverse Transcriptase”

RT-qPCR- transcrição reversa associada a PCR quantitativa em tempo real, (do inglês *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*)

SDN1- Nuclease de sRNAs, do inglês, “Small RNA Degrading Nuclease 1”

SE- SERRATE , enzima relacionada a ligação de pequenos RNAs ao complexo RISC

siRNA – Pequeno RNA de interferência, do inglês, “short interference RNA”

SPL- Do inglês, “SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like” fator de transcrição

sRNA – pequeno RNA, do inglês, “small RNA”

SSPs- proteínas de reserva

TAGs- Triacilgliceróis

ta-siRNAs – Do inglês, “trans-acting-siRNAs”

UTR- Região não traduzida

VIP1- VirE2-interacting protein 1

(WRI1)-WRINKLED1, fator de transcrição da família AP2

(2n)- Células diplóides

(3n) Células triplóides

RESUMO

Brassica napus (canola) é a terceira cultura oleaginosa mais produzida no mundo, fornecendo cerca de 13% de toda a oferta mundial de óleo vegetal. Durante o desenvolvimento de sementes, *B. napus* acumula compostos de reservas em estádios e tecidos específicos. A maioria destes compostos de reservas são lípidos (30-40%) e proteínas (17-26%), sendo quase que exclusivamente armazenados nos cotilédones do embrião maduro. Os microRNAs (miRNAs) desempenham um papel essencial em diversos aspectos do desenvolvimento de sementes. A função destes pequenos RNAs (sRNAs) endógenos não-codificantes é regular a expressão gênica, principalmente através da clivagem e a inibição de tradução de mRNA alvo. Estudos recentes têm contribuído para a identificação de miRNAs em sementes de *B. napus*, mas a expressão temporal e as funções regulatórias dos miRNAs em sementes de *B. napus*, especialmente durante a maturação, são desconhecidas. Para entender os padrões de expressão temporal dos miRNAs durante o desenvolvimento de sementes por RT-qPCR, este trabalho se concentra primeiramente na determinação de genes de referência para serem utilizados como normalizadores em estudos de RT-qPCR e no perfil de expressão dos miRNAs durante o desenvolvimento de sementes. A estabilidade da expressão de 16 mRNA e 43 miRNAs de *B. napus* foi avaliada em amostras de folha, tecidos florais e diferentes estágios de desenvolvimento de sementes. Nossas análises demonstraram que os miRNAs apresentam uma maior estabilidade de expressão do que genes que codificam proteínas, e a combinação miR156-7, miR11-1 e miR408-1 foi a mais apropriada para ser utilizada como normalizadores em estudos de expressão gênica por RT-qPCR. O perfil de expressão de 40 miRNAs foi avaliado ao longo do desenvolvimento de sementes. A maioria dos miRNAs teve sua expressão induzida durante a maturação de sementes, enquanto um pequeno número foi preferencialmente expressos em estágios iniciais do desenvolvimento das sementes. Um miRNA inédito, denominado miR03-1, apresentou uma expressão diferencial entre os estágios precoces e tardios do desenvolvimento. A expressão do miR03-1 é fortemente induzida 21 dias após o florescimento. A partir de uma abordagem computacional para predição de possíveis genes-alvo de miRNAs de *B. napus* foi possível identificar um total de 481 alvos putativos para 104 sequências maduras de miRNAs. Todos os alvos preditos estão diretamente relacionados com o metabolismo lipídico, dentre estes fatores de

transcrição e enzimas-chave do metabolismo lipídico. O estudo da regulação destes genes por miRNAs em diferentes estágios do desenvolvimento de semente contribuirá para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no metabolismo lipídico.

ABSTRACT

Brassica napus (canola) is the third largest oilseed crop in the world, providing approximately 13% of the world's supply of vegetable oil. During seed development, *B. napus* build up storage reserves in specific stages and tissues. The vast majority of these reserves are made up of lipids (30–40%) and proteins (17–26%) that are almost exclusively stored in the cotyledons of the maturing embryo. MicroRNAs (miRNAs) play essential roles in various aspects of seed development, including embryo development and the timing of seeds maturation. The function of these endogenous small non-coding RNAs (sRNAs) is to regulate gene expression, mainly through cleavage and translation inhibition of target. Several recent studies have contributed to the identification of miRNAs in seeds from *B. napus*, but temporal expression and regulatory functions of miRNAs in seeds of *B. napus*, especially during seed maturation, are unknown. To understand the temporal expression patterns of miRNAs during seed development by RT-qPCR, this work focuses primarily on the determination of appropriate reference genes for use in RT-qPCR studies and in the expression profile of miRNAs during seed development. The expression stability of 16 previously reported reference genes and 43 *B. napus* miRNAs have been evaluated in leaf and flower tissues, as well in different seed development stages. Our analyses showed that miRNAs presented higher expression stability than protein-coding genes and the combination of miR156-7, miR11-1 and miR408-1 was appropriate as normalizers in studies of gene expression by RT-qPCR. In addition, the expression profile of 40 miRNAs was studied throughout seed development. The majority of miRNAs increased their expression during seed maturation, while a small part of the miRNAs was preferentially expressed at early seed developmental stages. A new miRNA named miR03-1 showed differential expression between the early and late stages of seed development and is strongly induced 21 days after flowering. In parallel, a computational approach was carried out to predict candidate target genes for *B. napus* miRNAs. A total of 481 putative targets were predicted for 104 sequences of mature miRNAs. All predicted targets are directly related to the lipid metabolism, such as transcription factors and key enzymes of lipid metabolism. The study of regulation of these genes by miRNAs in different stages of seed development will contribute to understanding the molecular mechanisms involved in lipid metabolism.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A espécie *Brassica napus* e a canola cultivada

A canola (*Brassica napus* L. var *oleifera*) é uma espécie oleaginosa da família *Brassicaceae*, anteriormente conhecida como *Cruciferaeae*. Os primeiros relatos do cultivo de *B. napus* foram registrados nas antigas civilizações da Ásia e do Mediterrâneo. O gênero *Brassica* apresenta mais de 100 espécies, dentre as quais culturas agronomicamente importantes, como a mostarda (*Brassica nigra*), a couve (*Brassica oleracea*) e o nabo (*Brassica rapa*), estão presentes. A espécie *B. napus* ($2n=38$) é um alotetraplóide formada por eventos de hibridização inter-específica entre as espécies diplóides parentais *B. rapa* ($2n=20$) e *B. oleracea* ($2n=18$) (Jessop & Toelken 1986)

A canola é uma planta herbácea, anual, autógama com uma taxa superior a 20% de alogamia e muito visitada por insetos polinizadores, fato que proporciona um aumento no índice de fecundação e contribui para o aumento da produção de grãos. Apresenta raiz pivotante e um grande número de raízes secundárias fasciculadas. Possui haste ereta, ascendente e ramificada, podendo alcançar uma altura superior a 1,5 m na espécie *B. napus*. Os órgãos reprodutores são formados por um pistilo e quatro estames longos e dois curtos, sendo estes estéreis. A floração ocorre de forma ascendente e o fruto é uma siliqua que apresenta deiscência (Tomm, 2000).

Tradicionalmente, *B. napus* não é apropriada para a alimentação humana e animal devido a presença de dois agentes tóxicos que ocorrem naturalmente nas sementes, o ácido erúico e os glucosinolatos. No entanto, na década de 1970, programas de melhoramento em diversos países produziram variedades com teores significativamente mais baixos destes dois agentes tóxicos. O termo “canola” provém da expressão “Canadian Oil Low Acid”, e refere-se às variedades de *B. napus* que atendem as normas específicas para os níveis máximos de ácido erúico e glucosinolatos. Estas cultivares devem produzir óleo em sementes com menos de 2% de ácido erúico e os componentes sólidos da semente devem apresentar menos de 30 micromoles de glucosinolatos por grama de sólido seco ao ar (CODEX, 1999).

Atualmente, o cultivo de canola é realizado em diversas regiões do mundo. Na Europa, praticamente toda a canola produzida é do tipo invernal, semeada no outono e colhida no verão do próximo ano. No Brasil, devido às condições ambientais não atenderem as exigências do número de horas de frio requeridas pelas cultivares inverniais, somente cultivares de primavera são cultivadas (Tomm. 2000).

A canola é a terceira maior *commoditie* mundial, respondendo por 16% da produção de óleos vegetais, logo atrás da palma (34%) e da soja (33%). Os principais países produtores de canola são China, Índia e Canadá. No Brasil, os principais produtores de canola são os estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul, os quais atendem cerca de 60% da produção nacional (CONAB 2011). Ano após ano, o Brasil vem obtendo um aumento de produtividade. Na safra 2010/2011 foram produzidos aproximadamente 53,4 mil toneladas do grão em uma área de 46,3 hectares, representando o maior índice de produtividade de todos os anos. Os grãos de canola atualmente produzidos no Brasil possuem em torno de 24 a 27% de proteínas e de 34 a 40% de óleo. O óleo de canola é considerado um alimento altamente saudável, pois possui elevada quantidade de ômega-3 (benéfico à redução dos níveis de triglicerídios), vitamina E, gorduras mono-insaturadas e o menor teor de gordura saturada (atua no controle do colesterol) de todos os óleos vegetais. Na Europa, o óleo de canola é o mais utilizado para a produção de biodiesel (Tomm 2009).

1.2 Desenvolvimento de sementes e acúmulo de compostos de reserva

Em plantas que produzem sementes, denominadas espermatófitos, o desenvolvimento de sementes é um processo chave que liga duas gerações esporofíticas. Esta é uma estratégia essencial para a dispersão e sobrevivência das espécies, pois permite uma interrupção temporária do ciclo de vida (Bewley, 1997; Vicente-Carbajosa and Carbonero, 2005). A geração de plantas superiores é iniciada pelo evento de dupla fertilização, resultando na formação de um zigoto ($2n$) que originará o embrião, e a formação de um tecido vegetal de natureza triploide ($3n$), o endosperma. O endosperma está presente durante o processo de desenvolvimento de sementes e pode fornecer nutrientes para o embrião durante a embriogênese ou durante o processo germinativo.

A formação de sementes requer um desenvolvimento coordenado de tecidos de diferentes origens e compreende duas fases principais: morfogênese embrionária e maturação. Durante a morfogênese embrionária, o embrião se desenvolve através de uma série controlada de divisões celulares resultando na completa formação do embrião, o qual, muitas vezes possui um elevado conteúdo de macromoléculas de reserva em seus cotilédones. No decorrer da embriogênese identifica-se uma série de estádios particulares, pelos quais um embrião em desenvolvimento deve passar obrigatoriamente. Tais estádios são: globular, trapezoidal, codiforme, torpedo e embrião maduro (Figura 1) (West and Harada, 1993; Goldberg et al., 1994; Bewley, 1997; Vicente-Carbajosa and Carbonero, 2005). A fase de maturação é caracterizada pelo acúmulo de compostos de reserva nos tecidos da semente, aquisição da tolerância à dessecação e entrada do período de dormência (Goldberg et al., 1994).

Em *A. thaliana*, a fase de maturação ocorre no período de 7 a 20 dias após o florescimento e pode ser convenientemente dividida em três fases. De 7 a 10 dias após o florescimento a fase inicial de maturação corresponde à fase de crescimento embrionário e resulta na formação de um embrião completamente desenvolvido, o qual preenche a quase totalidade do volume da semente (Raz et al., 2001). Este rápido aumento no volume do embrião é acompanhado pelo acúmulo de pigmentos fotossintéticos. No início do processo de maturação o embrião apresenta elevadas concentrações de amido, enquanto que a síntese e a acumulação de lipídios e de proteínas de armazenamento estão em sua fase inicial (Hills, 2004). Durante a segunda fase do processo de maturação (11-16 dias após o florescimento), o teor de amido diminui, enquanto que altas taxas de ácidos graxos e proteínas podem ser observadas no embrião. (Baud et al., 2002). Finalmente, a última fase ocorre entre 17 e 20 dias após o florescimento. A síntese de compostos de reserva termina quando o embrião se torna metabolicamente quiescente e tolerante a dessecação. No final do processo, o conteúdo de água diminui de 32% para menos de 10%. Apesar desta perda drástica de água, a síntese compostos de armazenamento continua, com rafinose e estaquiase sendo especificamente armazenados durante este estágio de maturação tardia (Baud et al, 2002). A acumulação de tais oligossacarídeos, em conjunto com o aumento detectado em ambos os níveis de sacarose e trealose, pode participar na proteção de membranas e

proteínas, contribuindo assim para a aquisição de tolerância à dessecação (Bailly et al., 2001; Hoekstra et al., 2001).

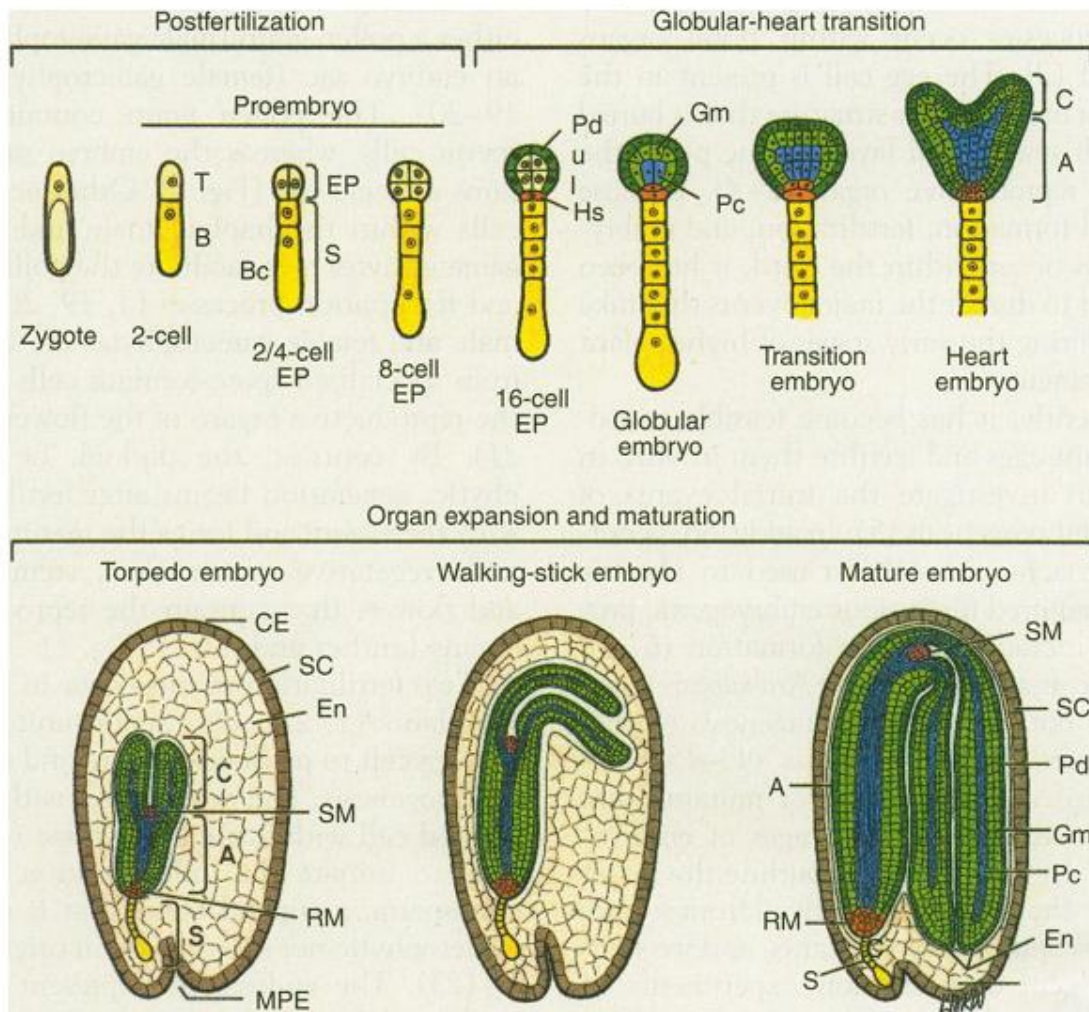


Figura 1: Visão geral da embriogênese em plantas: Representação esquemática do desenvolvimento do zigoto e do embrião, baseado em estudos de *A. thaliana* e *Capsella*. Abreviações: T, célula terminal; B, célula basal; EP, embrião propriamente dito; S, suspensor; Bc, célula basal do suspensor; Pd, protoderme; I, nível inferior; Pc, procâmbio; Gm, meristema basal; C, cotilédones; A, eixo; MPE, final micropilar; CE, final chalazal; SC, tegumento; En, endosperma; SM, meristema apical e RM, meristema da raiz (fonte Goldberg et al., 1994).

Apesar da diversidade de tamanho, forma e meio de dispersão, o armazenamento de compostos de reserva durante a fase de maturação das sementes é um processo comum às diferentes espécies. Os compostos de reserva em sementes geralmente

consistem de proteínas de reserva (SSPs), carboidratos (principalmente amido) e lipídios armazenados na forma de triacilglicerídeos (TAGs). A proporção relativa e a localização tecidual destes compostos são bastante variáveis, dependendo da espécie em estudo. Por exemplo, em *A. thaliana*, aproximadamente 60% do conteúdo total de ácidos graxos estão presentes nos cotilédones do embrião. Já na espécie *B. napus*, os cotilédones apresentam 90% do conteúdo total de ácidos graxos. O desenvolvimento de sementes em *Brassica* é caracterizado por um rápido aumento de massa fresca concomitantemente ao aumento de massa seca, e este padrão de acumulação de matéria seca é típico desta espécie (Bonington, 1975; Denis J. Murphy, 1989; Still David W and Kent J. Bradford, 1998).

1.3 Aspectos moleculares do desenvolvimento de sementes

Em virtude da grande importância das sementes na alimentação humana e a utilização dos diferentes compostos de reserva como matéria-prima industrial, a compreensão dos fatores genéticos e moleculares que definem o desenvolvimento embrionário e a composição química de sementes tem sido foco de muitas pesquisas (Barbara Mazur, Enno Krebbers, 1999; Le et al., 2010a; Dean et al., 2011; Troncoso-Ponce et al., 2011). Diversos genes são expressos durante o desenvolvimento das sementes e múltiplos níveis de controle (transcricional, postranscricional e postraducional) são necessários para assegurar a adequada expressão temporal e espacial destes genes. *A. thaliana* tem sido utilizada como planta modelo para investigar os mecanismos moleculares que controlam o desenvolvimento de sementes e para identificar os genes envolvidos no processo. Le e colaboradores (2010), utilizando Affymetrix GeneChip, demonstraram que aproximadamente 14.000 genes são expressos durante o desenvolvimento de sementes em *A. thaliana*. Dentre estes, 289 genes são expressos especificamente durante o desenvolvimento de sementes e 48 genes eram fatores de transcrição (Le et al., 2010b).

Em *A. thaliana*, a fase de maturação de sementes é controlada por pelo menos 4 fatores de transcrições: FUSCA3 (FUS3), ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (ABI3), LEAFY COTYLEDON1 (LEC1) e LEAFY COTYLEDON2 (LEC2). ABI3, FUS3, and LEC2 são fatores de transcrição contendo domínios de ligação ao DNA conservados (domínio B3) (Giraudat et al., 1992; Luerksen et al., 1998; Stone et al., 2001), enquanto

que LEC1 codifica fatores de transcrição do tipo CBF (Lotan et al., 1998). Todos os quatro mutantes, *abi3*, *lec1*, *lec2*, e *fus3*, têm o programa de maturação de sementes afetado e compartilham fenótipos comuns, como por exemplo, a expressão reduzida de proteínas de armazenamento (SSPs). Entretanto, os mutantes também apresentaram características específicas, como ausência da degradação da clorofila em semente seca (*abi3*), acúmulo de antocianina (*abi3* e *lec1*), intolerância a dessecação (*abi3*, *fus3* e *lec1*) e reduzida sensibilidade a ABA *abi3* e *lec1* (Keith et al., 1994; Meinke et al., 1994; Parcy et al., 1994; West et al., 1994; Nambara et al., 1995; Lotan et al., 1998; Luerssen et al., 1998; Vicient et al., 2000; Raz et al., 2001; Stone et al., 2001; Kroj et al., 2003).

O padrão de expressão destes quatro genes- FUSCA3, ABI3, LEC1 e LEC2- durante o desenvolvimento de sementes já foi caracterizado em *A. thaliana*: LEC1 é especificamente expresso em sementes, sendo detectado no embrião e no endosperma durante a embriogênese (Lotan et al., 1998). LEC2 é expresso principalmente durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, embora também seja detectado em tecidos vegetativos (Stone et al., 2001; Kroj et al., 2003). A expressão de FUS3 é principalmente detectada no tecido protodermal do embrião (Gazzarrini et al., 2004; Tsuchiya et al., 2004). Trabalhos recentes demonstraram que ABI3 é expresso por todo tecido embrionário, o qual é consistente com o padrão de expressão dos seus genes alvo (To et al., 2006).

Em *A. thaliana*, análises de microarranjos revelaram expressão diferencial de genes envolvidos no metabolismo lipídico durante a maturação de sementes. Genes que codificam enzimas participantes da síntese de ácidos graxos exibem um alto padrão de expressão no início da fase de maturação, enquanto os níveis de expressão de genes que codificam enzimas modificadoras de ácidos graxos e oleosinas aumentam posteriormente (Girke et al., 2000). A transcrição de genes que codificam enzimas plastidiais da via glicolítica e genes que codificam enzimas da via de biossíntese de ácidos graxos acumulam de uma forma coordenada durante a maturação de sementes (Le et al., 2010a). Esta observação sugere que estes genes podem ser co-regulados. Apesar da compreensão das vias metabólicas envolvidas na biossíntese de TAGs, e até mesmo, dos genes que codificam as enzimas envolvidas no processo, o nosso

conhecimento sobre o controle metabólico da acumulação de TAGs permanece incompleto.

O mutante WRINKLED1(WRI1) de *A. thaliana* apresenta considerável diminuição no acúmulo de TAGs em sementes (Focks and Benning, 1998). WRI1 codifica um fator de transcrição da família APETALA2-ethylene responsive element-binding protein (AP2-EREBP) e especifica a ação reguladora de LEC2 e, possivelmente, LEC1 para a rede de biossíntese de ácidos graxos (Baud S et al., 2007) WRI1 interage com sequencias promotoras de PKp- β 1, BCCP2 e KAS1 (genes envolvidos no metabolismo lipídico) *in vitro* e/ou em experimentos de *one-hybrid system* em levedura (Baud and Lepiniec, 2009; Maeo et al., 2009). A sequência AW-box [CnTnG(n)7CG], identificada na região promotora de diversos genes das vias glicolíticas e biossíntese de ácidos graxos, foi proposta como o sítio de reconhecimento de WRI1 (Maeo et al., 2009). Considerando que o acúmulo de transcritos dos genes alvo de WRI1 não é completamente abolido em mutantes *wri1* nulo, é possível especular que existam outras formas de regulação da expressão gênica, tais como a regulação de transcritos por microRNAs.

1.4 MicroRNAs

O funcionamento de organismos multicelulares depende de complexas vias de regulação gênica. Pequenos RNAs (20-30 nt) não-codificantes têm emergido como componentes chaves na regulação da expressão gênica em níveis transcricionais e pós-transcricionais (Carthew and Sontheimer, 2009; Chen, 2009a; Voinnet, 2009). Com base na sua origem, estrutura e função biológica, os pequenos RNAs são classificados em três grandes categoriais: microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs de interferência (siRNAs) e RNAs que interagem com a enzima PIWI (piRNA), sendo este último específico de animais (Carthew and Sontheimer, 2009). O primeiro miRNA descoberto foi *lin-4* em *Caenorhabditis elegans*, sendo essencial ao controle temporal normal de diversos eventos do desenvolvimento pós-embriônico (Lee et al., 1993). Foi verificado que tal controle se dava pela regulação dos níveis da proteína LIN-14 e que o produto do gene *lin-4* não era uma proteína, mas uma sequência de RNA de 22nt. O fato de que este sRNA era complementar a sequências na região 3' não traduzida (3'UTR) do RNA mensageiro (mRNA) de *lin-14* sugeriu que *lin-4* regula a tradução de *lin-14* via

interação RNA-RNA (Lee et al., 1993). Anos depois, foi identificado neste mesmo organismo outro miRNA regulado temporalmente (Reinhart et al., 2000): Let-7, de 21nt e complementar a 3'UTR de vários genes, controlando negativamente sua expressão em muitos animais bilaterais, incluindo seres humanos (Pasquinelli et al., 2000).

miRNAs são codificados por genes *MIR* que se encontram amplamente distribuídos no genoma de plantas e animais (Bartel, 2009; Chen, 2009a). Os primeiros miRNAs de plantas foram descritos em *A. thaliana* (Park et al., 2002), e desde então, extensivamente estudados. Diferentemente dos genes *MIR* em animais, os quais são localizados principalmente dentro de outros genes nas regiões intrônicas, a maioria dos genes *MIR* em plantas são encontrados em regiões intergênicas, apresentando suas próprias unidades transcricionais, caracterizada por uma região promotora e terminadora (Megraw et al., 2006; Cui et al., 2009; Voinnet, 2009). miRNAs regulam a expressão dos seus genes alvo, atuando principalmente ao nível pós-transcricional, por meio de interações RNA-RNA (Ha et al., 2008). Entretanto, a regulação da tradução de proteínas e da transcrição via metilação de DNA também tem sido reportada (Brodersen et al., 2008; Wu et al., 2010).

Desde que os miRNAs foram descritos, vários avanços foram feitos para um melhor entendimento da sua biogênese, modo de ação e efeitos biológicos. A transcrição dos genes de miRNAs em plantas é realizada por uma RNA polimerase do tipo II, originando longos miRNAs primários (pri-miRNAs). Os pri-miRNAs são comparáveis aos genes codificadores de proteínas em tamanho e também pela adição de 5'CAP e caudas poli(A). Uma enzima RNase III, DICER-LIKE 1 (DCL1), cliva o pri-miRNA, liberando o precursor (pré-miRNA) em forma de grampo que contém dois braços fortemente pareados (miRNA em um braço pareado com o miRNA* no outro braço). Em plantas, ainda no núcleo, o pré-miRNA é clivado novamente por DCL1, em conjunto com as proteínas acessórias SERRATE (SE) e HYPOPLASTIC LEAVES1 (HYL1), liberando o duplex miRNA:miRNA* (Kidner and Martienssen, 2005; Zhang et al., 2006; Voinnet, 2009) (Figura 2). Esta clivagem pode ocorrer em duas direções: da base para a alça (“stem-to-loop”), como a maioria dos pré-miRNAs de plantas; ou na orientação inversa, da alça para a base (“loop-to-base”), como os longos precursores de MIR319 e MIR159 (Li et al., 2011).

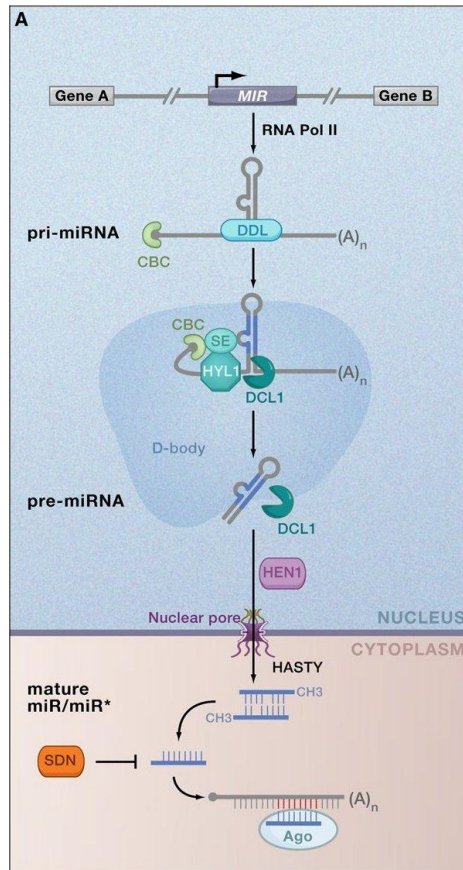


Figura 2: Biogênese de microRNAs. Os pri-miRNAs transcritos por uma RNA Polimerase II são estabilizados pela proteína Dawdle (DDL), até o processamento do pré-miRNA no D-body, composto pelas proteínas: Serrate (SE), Hyponastic Leaves 1 (HYL1), Dicer-like1 (DCL1) e nuclear cap-binding complex (CBC). O pré-miRNA resultante é novamente clivado por uma DCL1, gerando o miRNA maduro, que será exportado para o citoplasma pela proteína de membrana HASTY, metilado pela HEN1. Uma das fitas do miRNA é carregada pela AGO ao seu transcrito alvo, enquanto que a outra é degradada (fonte, Voinnet, 2009).

O duplex miRNA:miRNA* sofre metilação em ambos os terminais 3' pela metiltransferase HEN1 e depois é exportado para o citoplasma pela proteína HASTY (HST), homóloga à exportina de animais. Uma das fitas (fita guia) é preferencialmente incorporada por uma proteína Argonauta (AGO) ao complexo RISC (Figura 2) (Kidner and Martienssen, 2005; Zhang et al., 2006; Voinnet, 2009). Em plantas há muitos membros da família AGO envolvidos em diferentes vias de biogênese de sRNAs. Foi demonstrado que a incorporação do miRNA em complexos RISC, contendo AGOs

específicas, depende do nucleotídeo da extremidade 5' do miRNA maduro (Mi et al., 2008) e que ocorre competição entre miRNAs e outros sRNAs para o carregamento em RISC (Meng et al., 2011).

O mecanismo de ação é dependente do nível de complementaridade de bases entre o miRNA e o sítio alvo, causando o silenciamento gênico pós-transcricional por clivagem ou bloqueio da tradução do mRNA (Aukerman and Sakai, 2003). Em plantas, a maioria dos miRNAs apresentam alto grau de complementaridade com seus alvos (Voinnet, 2009). A clivagem direcionada pelo miRNA acontece, em geral, no centro da complementaridade entre o miRNA e o mRNA, no resíduo que pareia com o décimo ou décimo primeiro nucleotídeo do miRNA (Yang et al., 2007). Uma única molécula de miRNA pode mediar o silenciamento de vários transcritos do gene alvo acoplado ao miRISC. Para um alvo ser efetivamente regulado por um miRNA é necessária sua coexpressão temporal e espacial (Naqvi et al., 2012).

Os miRNAs são agrupados em famílias gênicas de acordo com a similaridade da sequência madura. Atualmente dez famílias MIR foram identificadas em todas as angiospermas, enquanto as outras famílias exibem uma distribuição taxonômica restrita. Por exemplo: MIR824, MIR2111 e MIR403 são famílias específicas de eudicotiledoneas. MIR472, por exemplo, está presente em todas as rosídeas, enquanto MIR857 é restrito apenas a um pequeno conjunto do clado eurosíde. Algumas famílias de miRNAs são específicas de determinadas famílias de plantas ou ainda podem ser gênero ou espécie específicas. MIR158, MIR161, MIR391, MIR400, MIR447, MIR771, MIR824, MIR838, MIR858 e MIR866 são específicas do gênero *Brassica* (Josh T. Cuperus, Noah Fahlgren, 2011). Certas famílias possuem um grande número de membros (miR156, miR166, miR169), enquanto outras apresentam um ou dois (miR162, miR390). Entretanto, estes números podem variar consideravelmente entre diferentes espécies vegetais (Jones-Rhoades et al., 2006). Em *A. thaliana* 338 sequências maduras de genes MIR foram agrupados em 48 famílias. Dentre estas, 21 famílias são conservadas entre outras espécies vegetais, incluindo arroz, milho, sorgo, canola (miRBase, release 19.0). miRNAs também foram identificados na alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, demonstrando que não são exclusivos de plantas multicelulares (Molnár et al., 2007).

A maioria dos RNAs regulatórios, incluindo miRNAs, foram identificados pelo sequenciamento em larga escala de bibliotecas de cDNAs de populações de RNAs de baixo peso molecular. Duas estratégias contribuíram consideravelmente para a identificação e caracterização de conservados miRNAs em plantas: abordagens computacionais, (bioinformática) e métodos experimentais (estratégias de clonagem). A principal estratégia por trás da abordagem computacional é encontrar sequências homólogas de miRNAs conhecidos, tanto dentro de um único genoma como entre genomas de organismos relacionados. A obtenção e o sequenciamento de bibliotecas de pequenos RNAs representam uma abordagem experimental para a identificação e caracterização de pequenos RNAs. No entanto estas abordagens apresentam algumas limitações. Em primeiro lugar, a maioria dos miRNAs são expressos em tecidos específicos e temporalmente específicos. Além disso, diversos miRNAs são expressos principalmente em resposta a estímulos ambientais específicos. Eles também coexistem com seus mRNAs alvo clivados e degradados, portanto a clonagem de pequenos RNAs (miRNA e siRNA) é bastante dificultada (Sunkar et al., 2005).

A estratégia de identificação de miRNAs utilizando clonagem seguida de sequenciamento de pequenos RNAs permite principalmente a identificação de miRNAs que são conservados e altamente abundantes em muitas espécies de plantas (Jones-Rhoades et al., 2006; Bartel, 2009) Entretanto a aplicação de tecnologias avançadas de sequenciamento em larga escala constitui uma importante ferramenta para a identificação de miRNAs de baixa abundância e de miRNAs espécie-específicos (Kulcheski et al., 2011; Körbes et al., 2012; Xu et al., 2012). Recentemente, diversos trabalhos foram realizados utilizando tecnologias de sequenciamento em larga escala para a identificação de miRNAs em amostras de sementes de diferentes espécies (Song et al., 2011; Curaba et al., 2012; Körbes et al., 2012; Huang et al., 2013).

1.5 Atuação dos microRNAs no desenvolvimento de sementes

Em plantas, os miRNAs estão envolvidos na regulação de diversos processos tais como resposta a hormônios, a estresses bióticos e abióticos, diferenciação celular e desenvolvimento (Jones-Rhoades et al., 2006; Chen, 2009b). Os miRNAs também desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de sementes. Mutantes desprovidos de componentes da biogênese, processamento e carregamento de miRNAs

normalmente apresentam defeitos no desenvolvimento embrionário (Chen, 2009a). Recentemente, Willmann e colaboradores, observaram que embriões mutantes *dcl1-15*, cuja mutação foi detectada no sítio ativo da enzima que realiza o processamento dos miRNAs, alcançam a maturidade precocemente (Willmann et al., 2011). Alguns processos que caracterizam o programa de maturação embrionária, como por exemplo; desenvolvimento do cloroplasto e a síntese de materiais de armazenamento foram induzidos precocemente no mutante *dcl1-15*, caracterizando-o como um mutante heterocrônico (mudança no tempo a que certos eventos ocorrem durante o desenvolvimento). Este fenótipo de maturação precoce em mutantes *dcl1-15*, é provavelmente devido à desregulação de um ou mais genes-alvo de miRNA (Willmann et al., 2011).

Análises de microarranjo revelaram que genes importantes para a regulação positiva do programa de maturação das sementes, LEC2 (*Leafy-cotyledon2*) e FUS3 (FUSCA3), foram induzidos em mutantes *dcl1-15*. Estes resultados sugerem que DCL1 atua na repressão dos genes FUS3 e LEC2 durante os estágios iniciais da embriogênese, e que a perda da funcionalidade dos miRNAs levam a sua expressão ectópica. Análises de duplo mutantes *lec2-1 dcl1-15* e *fus3-3 dcl1-15* demonstraram que *lec2-1* e *fus3-3* reduzem o fenótipo de *dcl1-15*, confirmando que LEC2 e FUS3 são necessários para fenótipo de maturação precoce do mutante *dcl1-15*. Esses resultados demonstram que miRNAs são responsáveis, direta ou indiretamente, por reprimir FUS3, LEC2 e, possivelmente, outros indutores do programa de maturação do embrião (Willmann et al., 2011).

Os genes que codificam as proteínas *Arabidopsis 6 B-Interacting Protein -Like 1* (ASIL1), ASIL2 e *Histone Deacetylase6* (HDA 6/SIL1), os quais estão envolvidos na regulação negativa do programa de maturação de sementes durante os estágios iniciais do desenvolvimento, foram reprimidos no estágio embrionário de torpedo em mutantes *dcl1-15*. Análises de combinações de simples e duplos mutantes *asil1-1*, *asil2-1* e *sil1-1* revelaram que estes genes atuam de forma redundante, reprimindo o programa de maturação durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (Willmann et al., 2011). Estes resultados sugerem que durante os estágios iniciais da embriogênese, miRNAs específicos regulam negativamente a expressão de um ou mais genes alvos,

tanto para promover a ativação de repressores ou reprimir genes ativadores da maturação. Cerca de 50 genes alvo de miRNAs são superexpressos em embriões mutantes *dcl1*, o qual exibe defeitos durante o desenvolvimento embrionário, sugerindo que a prevenção da ocorrência prematura de alguns programas de desenvolvimento por miRNAs é essencial para manter o desenvolvimento embrionário (Nodine and Bartel, 2010).

Recentemente, estudos em *B. napus* utilizando as tecnologias de sequenciamento de última geração identificaram miRNAs e possíveis genes-alvo, em estágios específicos do desenvolvimento de semente (Körbes et al., 2012; Huang et al., 2013). Wang e colaboradores identificaram e confirmaram por 5'RACE que um fator de transcrição da família bZIP (VIP1) é alvo de um novo miRNA de *B. napus*, miR6029 em amostras de sementes, (Wang, 2012). Considerando que o tempo de expressão de miRNAs individuais é fundamental para a sua atuação, se faz necessário entender as funções regulatórias do número crescente de miRNAs e genes-alvo identificados até o momento em sementes de *B. napus*. Portanto, estudos de expressão gênica de miRNAs são fundamentais para elucidar a atuação estágio-específica dos miRNAs durante o desenvolvimento de sementes em *B. napus*. Neste contexto, a utilização de PCR quantitativo em Tempo Real é uma alternativa ao tradicional Northern Blot por permitir a quantificação de expressão de um grande número de genes simultaneamente.

1.6 PCR Quantitativo em Tempo Real e Genes-Referência

Métodos eficientes de estudos de expressão gênica têm permitido a análise de um grande número de genes envolvidos nos diversos processos biológicos, desde o desenvolvimento dos organismos até suas interações com fatores ambientais (Donson et al., 2002). Nos últimos anos, um método bastante utilizado para a avaliação da expressão gênica é amplificação quantitativa de cDNAs (RT-qPCR), devido à rapidez, especificidade e sensibilidade com que esta técnica detecta e quantifica ácidos nucleicos (Gachon et al., 2004).

A quantificação por RT-qPCR necessita de uma série de padronizações de vários parâmetros tais como quantidade inicial da amostra, integridade e quantidade de RNA, eficiência enzimática da síntese de cDNA e da amplificação da PCR, e principalmente o

uso de genes de referência adequados (Bustin, 2002; Bustin et al., 2009). Dois métodos de quantificação da expressão gênica são geralmente utilizados: quantificação absoluta e quantificação relativa. Na quantificação absoluta, o número absoluto de cópias de mRNA é determinado por comparação a uma curva padrão determinada (Pfaffl and Hageleit, 2001). A quantificação relativa é baseada na taxa de expressão de um gene alvo comparada com um gene de referência. Este tipo de quantificação pode ser muito eficaz, mas os resultados são fortemente dependentes do gene de referência e dos métodos de normalização a serem utilizados (Pfaffl and Hageleit, 2001). Segundo Vandesompele e colaboradores (2002), para uma quantificação da expressão gênica com acurácia, devem-se usar múltiplos genes de referência, sendo que o mínimo ideal são os três genes de referência mais estáveis (Vandesompele et al., 2002). Alguns modelos matemáticos foram desenvolvidos para o cálculo da expressão relativa, os quais podem ou não usar a correção da eficiência (Livak and Schmittgen, 2001; Pfaffl and Hageleit, 2001).

Os genes de referência comumente utilizados são codificadores de proteínas, principalmente os responsáveis pela manutenção das estruturas e metabolismo básicos da célula, como por exemplo, tubulinas (Choi et al., 1991) e actinas (Jian et al., 2008). Além disso, são utilizados RNAs ribossomais, tais como 18S e 28S rRNA (Gong et al., 2001). Porém, a estabilidade de expressão destes genes pode variar consideravelmente entre diferentes tecidos e amostras e, portanto, diversos estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de escolher o gene mais adequado para cada experimento (Thellin et al., 1999; Vandesompele et al., 2002; Paolacci et al., 2009). Recentemente, a descoberta de miRNAs como reguladores de processos chaves do desenvolvimento de organismos eucariotos levou a especulação de sua possível utilização como genes de referência em estudos de RT-qPCR (Davoren et al., 2008; Lim et al., 2011). Em plantas superiores, como soja e trigo, foi demonstrado que miRNAs apresentam uma melhor estabilidade de expressão que genes codantes, especialmente em amostras de folhas de plantas submetidas a estresses bióticos e abióticos (Kulcheski et al., 2010; Feng et al., 2012).

Genes normalizadores, do tipo codificadores de proteína, já foram determinados para estudos em sementes de *B. napus*, porém somente oito genes foram avaliados e

demonstraram uma baixa estabilidade de expressão durante o desenvolvimento de sementes. Além disso, o número ótimo de genes de referência a serem utilizados para uma normalização eficiente dos dados de RT-qPCR não foi determinado (Chen et al.,2010).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar o perfil de expressão de microRNAs durante o desenvolvimento de sementes de *Brassica napus*, além de identificar seus potenciais transcritos-alvo envolvidos no metabolismo lipídico.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar e validar genes de referencia para estudos de expressão gênica por RT-qPCR em sementes de *B. napus*;
- Avaliar o padrão expressão de miRNAs identificados em sementes de *B. napus*;
- Identificar os possíveis genes alvos envolvidos no metabolismo lipídico de miRNAs identificados em sementes de *B. napus*;

CAPÍTULO I- Seleção de genes de referência para a quantificação relativa de miRNAs durante desenvolvimento de sementes em *B.napus*

Este capítulo está apresentado na forma de um manuscrito intitulado “Selection of reliable reference genes for relative quantification expression of miRNAs during seed development in *B. napus*” a ser submetido ao periódico *Plant Physiology and Biochemistry*.

Selection of reliable reference genes for relative quantification expression of miRNAs during seed development in *B.napus*

Ronei Dorneles Machado^{a†}, Ana Paula Körbes^{a,b†}, Guilherme Loss-Morais^a, Ana Paula Christoff^b, Márcia Margis-Pinheiro^{a,b}, Rogério Margis^{a,b,c*}

^a PPGBCM, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b PPGGBM, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Email addresses:

RDM: dornelesronei@gmail.com

APK: apkorbes@gmail.com

GLM: guilherme.loss@gmail.com

APC: anachff@gmail.com

MMP: marcia.margis@ufrgs.br

RM: rogerio.margis@ufrgs.br

[†] Authors contributed equally to this manuscript

* Corresponding author: rogerio.margis@ufrgs.br

Abstract

Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) is a precise and sensitive technique widely used to analyze gene expression levels. However, appropriate reference genes should be used for correct analysis and interpretation of results. MicroRNAs (miRNAs) are fundamental regulatory genes of eukaryotic genomes, acting on several biological functions. Transcription accumulation of miRNAs has been studied using RT-qPCR, but no validated reference genes for miRNAs in *Brassica napus* are currently available. In this study, the expression of 16 previously reported reference genes and 43 *B. napus* miRNAs were evaluated in leaf and flower tissues and different stages of seed development. The expression stability of candidate reference genes was analyzed using geNorm and NormFinder softwares. Candidate miRNAs showed higher expression stability than protein-coding genes. The combination of miR156-7 and miR11-1 were the two most reliable reference genes in seeds, flower and all samples data sets. To evaluate the most stable candidate reference genes in seed samples, the expression profile of DGAT1 gene was normalized by the three most stable miRNAs reference genes (miR156-7, miR11-1 and miR408-1) and by the three most stable mRNA reference genes (PP2A, Ukn1, ACT7). The expected expression pattern of DGAT1 in stages of seed development was obtained when miRNAs were used as reference gene. These results highlight the importance of the selection of suitable reference genes in gene expression studies. In conclusion, the most stable miRNA reference genes identified in this study can be employed in the normalization of both miRNAs and mRNA RT-qPCR expression studies in *B. napus*.

Keywords: microRNAs, Internal controls genes, Quantitative RT-PCR, *Brassica napus*, rapessed

1. Introduction

Gene expression analyses have proved to be a great method to improve understanding of important biological processes. Quantitative real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR) has been shown to be a powerful tool to quantify transcript expression levels due to its good reproducibility, high sensitivity and broad quantification range. However, RNA quality and integrity, variation in cDNA synthesis, as well as the PCR reaction efficiencies are factors that can affect the reliability of results evaluation by RT-qPCR [1]. Therefore, normalization for transcript levels of test genes is crucial to minimize some technical variations. Strategies have been proposed to normalize RT-qPCR data, but the most commonly used method is relative quantification. Using this method, the expression level of a gene of interest is normalized to the expression level of a reference gene [2,3].

An ideal reference gene is expected to be stable at an expression level in several experimental conditions such as plant developmental stages, tissue types and external stimuli [4]. Reference genes frequently used are involved in basic cellular processes and are protein-coding genes, such as cytoskeleton construction (actins), glycolysis (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)–(GAPDH), protein folding (cyclophilin), synthesis of ribosomal subunits (rRNA), electron transport and protein degradation (ubiquitin) [5, 6]. However, recent studies have shown that these reference genes might not be stably expressed under different experimental conditions [7,8].

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs essential regulatory genes of eukaryotic genomes that play important roles in plant development, hormone signaling transduction and adaptation to a variety of biotic and abiotic stresses [9–11]. In seeds, a specific subset of miRNAs are involved in embryogenesis, while a different subset of miRNAs may be responsible for seed maturation, therefore the timing of expression of individual miRNAs also appears to be important [12,13]. *Brassica napus*, known as Oilseed Rape, is one of the most importantly economical and biofuel crops. (www.faostat.fao.org). Member of Brassicaceae family, *B. napus* possesses approximately 40% of lipids stored in the cotyledons of the maturing embryo seeds [14]. Recently, new miRNAs were identified in seeds of *B. napus* using deep

sequencing [15,16], but the expression patterns and functions of *B. napus* miRNAs, from seed development stages to maturation remain largely unknown.

Due to the small size of miRNAs (19–24 nucleotides) it is a great challenge for RT-qPCR detection. A novel miRNA quantification method has been developed using stem–loop RT followed by qPCR analysis [17,18]. Stem–loop RT primers is better than conventional ones PolyA RT-PCR in terms of RT efficiency and specificity. In addition, stem–loop primers can be used to specifically convert the mature functional miRNA into its DNA complement and can potentially be used for multiplex reverse transcription (RT) reactions [18]. Due to the ability of characterizing the miRNAs expression by RT-qPCR, there has been more researches involving the expression of miRNAs in recent years. However, it is necessary to screen and identify suitable reference genes for normalizing these transcripts. Several studies on humans and porcines have showed that miRNAs expression levels were much more constant under different conditions than protein coding genes in RT-qPCR studies [19–21]. John and co-workers tested the stability of expression of ten miRNAs by RT-qPCR in different tissues of porcine and found that individual miRNAs were stable in all test conditions [22]. Recently, studies in plants, for example, wheat and soybean, showed that miRNAs had better expression stability than protein-coding genes in several conditions [23,24]. miRNAs were most stable than protein-coding genes in samples of wheat after biotic and abiotic stress treatments [24]. Kulcheski *et. al.* demonstrated that microRNAs are optimal reference genes not only for other miRNAs but also for protein-coding genes in RT-qPCR analysis [23].

Due to the lack of optimal reference genes for RT-qPCR analysis in *B. napus* seeds, we selected a set of miRNAs and a set of mRNAs commonly used for normalization to search for highly stable reference genes. For this study, the expression stability of 43 miRNAs and sixteen candidates mRNA were tested in leaf and flower tissues and different stages of seed development. The analysis showed that miRNAs expression stability is higher than protein-coding genes in almost all the conditions tested and therefore miRNAs can be used as optimal reference genes for both miRNAs and protein-coding genes in RT-qPCR analysis of gene expression in soybean.

2. Results and discussion

2.1. PCR efficiency and amplification specificity

A total of 59 candidate genes, including forty-three miRNAs and sixteen protein-coding genes, were selected to test for stability of gene expression in 40 different samples. The amplification efficiency for each pair of primers was determined by RT-qPCR and calculated from the amplification curve using LinReg PCR assay as previously described [25,26]. Optimal amplification conditions are absolutely essential for accurate and reproducible quantification of samples by RT-qPCR. The hallmarks of an optimized RT-qPCR assay are: Linear standard curve, $R^2 > 0.980$ amplification efficiency ranges from 1.8 to 2.1. The primer efficiency indicates the amplicon doubling rate of a specific primer pair during a PCR. The R^2 value indicates the quality of the fit of the standard curve to the plotted data points. According to the criteria, nine candidate genes, miR167-2_6, miR158-16, miR164_51, miR393-1_2, miR172-1, miR319-130, miR400-185, miR09-1, miR396-164, were discarded from further stability analysis. In this study, the efficiency values of the 50 candidate reference genes ranged from 1.80 to 2.0 and $R^2 > 0.98$ as listed in supplementary Table 1 and Table 1. The results reflected the high quality and specificity of the PCR reactions for these candidate genes and will therefore be further evaluated.

2.2. Expression stability of candidate reference genes

To test the suitability of the 50 genes, two different softwares were used to evaluate the expression stability of the candidate reference genes: geNorm [27] and NormFinder [28]. The expression stability of these 50 genes was analyzed based on four different data sets: (1) all 40 samples, including flower, leaf and different stages of seed development; (2) different stages of seeds development; (3) flower samples; and (4) leaf samples.

2.2.1. geNorm analysis

geNorm ranks the reference genes by calculating the gene expression stability value M , based on the average pairwise expression ratio. The lowest M value indicates the most stable expression, whereas the highest M value indicates the least stable

expression. The program recommends using M value below the threshold of 1.5 to identify reference genes with stable expression. When we analyzed all 40 tissues samples [Fig. 1A] the average expression stability values (M) of miRNAs were lower than the M values of protein coding genes. miR156-7 and miR11-1 were the most stable combination of all tested genes, indicating that they are the most stable candidate genes in this group. In the data set of different stages of developing seeds [Fig. 1B] and in the sample set of flowers [Fig. 1C], miRNAs were also more stable than protein coding genes. Likewise, miR156-7 and miR11-1 were the best combination of reference genes for the data set of different stages of developing seeds. In the case of flower tissues, miR156-7 and 408-1 were the most stable combination and the miRNA11-1 was the third most stable in this data set.

As discussed above, miRNAs were more stable than mRNAs [Fig. 1], but this was not the case for all sample tissues set. Interestingly, protein-coding genes were more stable than miRNAs only in the group of leaf samples. The genes PP2A, UBC and TIP41 were the most stable in this data set. However, miRNAs showed M values below the threshold of 1.5, indicating that miRNAs also have stable expression [Fig. 1D]. TIP41-like protein (TIP 41) was the most stable gene, with an M value of 0.10 [Fig. 1D]. Studies of reference genes for expression analysis in *B.napus* showed that TIP 41 was between the top four choices of stably expressed reference genes for vegetative tissues [5].

Chen [5] previously reported that ACT7 and UBC21 were the most stable genes among different stages of embryo development in *B. napus*. In another study, ACT7 was also described as the most stable gene among different stages of seeds development in peanut [29]. Although ACT7 had the lowest stability value of all mRNA candidates in our studies, miRNAs were more stable than ACT7 gene after geNorm analysis [Fig. 1B]. Although some authors use only a single gene as an internal control for normalization, it is recommended the use of two or more reference genes for RT-qPCR studies results [27]. In order to accurately measure the expression levels, a normalization method using multiple reference genes instead of one is required. geNorm provides such a tool for analyzing the pairwise variation (V). With a pairwise variation set to 0.15, V values below this cutoff indicates that is unnecessary to include an additional control gene for reliable normalization. To evaluate the optimal number of

genes required for accurate normalization, we calculated the pairwise variation for all four data sets. In data set of flowers and leaves [Fig. 1E], the combination of the two most stable genes would be sufficient for normalization purposes, because the $V_{2/3}$ value was lower than 0.15. In the case of all samples set and the developing seed data set, the pairwise variation $V_{2/3}$ was 0.19 and 0.166 respectively. Therefore the use of three genes, $V_{3/4}$; 0.14 and 0.133 are indicated to normalize gene expression in these two data sets respectively. Additionally, using a combination of the three most stable genes, the V value actually increases for the flowers and leaves data set, but still remains below the cutoff value (0.15). In all samples set and developing seed data set, the increase of the number of inner reference genes did not contribute to the accuracy of normalization. In our analyses, the combination of miR156-7, miR11-1 and miR408-1 was appropriate for comparisons of all samples set ($V < 0.133$) and the different stages of seed development ($V < 0.118$), whereas the miR156-7 and miR408 pair was suitable for flowers dataset ($V < 0.04$).

2.2.2. Norm Finder Analysis

Stability of expression was also analyzed using the program NormFinder. NormFinder is an algorithm based on variance estimation and identifies the optimal normalization gene among a set of candidate genes under a given set of experimental conditions. In contrast to geNorm, NormFinder includes intra- and intergroup variations when calculating the normalization factor (NF). Candidate genes with the minimal intra and intergroup variation will have the lowest stability value and will be ranked at the top. The results of the NormFinder analysis applied to our data sets are summarized [Fig 2]. Interestingly, the miR156-3_3 was the most stable gene in two out of four data sets and it was the second most stable gene in leaf samples [Fig. 2A, Fig. 2B, Fig. 2D]. The developing seed set, all samples set and leaves data set showed low difference of stability between the eight best-ranked genes [Fig. 2A, Fig. 2B, Fig. 2D]. The miR156-7 appears on the top of the ranking in two data sets [Fig. 2A, Fig. 2B]. The miR824-1 was the most stable candidate in flowers tissues [Fig. 2C], while TIP41 was most stable in leaf tissues [Fig. 2D]. Despite the differences in the calculation method, the NormFinder results were similar to the results obtained by geNorm. A visible variation in the

geNorm and NormFinder rankings of the genes were observed, but in general, miRNAs were more stable when compared to the mRNA candidates.

2.3. Validation of putative reference genes

The use of different reference genes to calculate relative expression data could have a significant influence on the final normalized results. To evaluate the effect of mRNA and miRNAs as reference gene on the outcome of a practical experiment, we monitored the difference in the relative expression patterns of the functional gene, Diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1), in five different development stages of *B.napus* seeds. Diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) catalyzes the acyl-coenzyme A (CoA)-dependent acylation of sn-1,2-diacylglycerol to form triacylglycerol in the last step of the synthesis process. In *B.napus*, DGAT1 shows low expression in early stages of seeds development up to 20 days after opening (DAF), followed by increased expression in the latter stages of development (up to 35 DAF) [30].

The most stable miRNAs and mRNAs from developing seed data set were used as internal control. Initially, to check the impact of the use of mRNA and miRNA as reference genes, the target DGAT1 was normalized using the three best mRNA candidate reference genes and the three best miRNA candidate reference genes determined by geNorm. When DGAT1 was normalized by the combination of miRNA, the expression pattern was consistent to the relative expression patterns reported in other studies [30]. However, when DGAT1 was normalized using the best combination of mRNA candidate reference genes, DGAT1 showed a considerable increase in transcript levels in early stages of seeds development [Fig. 3A]. These results did not support the reported expression data of DGAT1 in which its expression is low in early stages of seed development up to 20 (DAF) [30]. Our results demonstrate that miRNAs are better reference genes than mRNA in RT-qPCR analysis of samples of *B.napus* seeds.

In order to analyze the impact of the optimal number of reference genes to be used for the normalization, we performed normalization for DGAT1 gene expression data by using one, two or three reference genes. In the first case, DGAT1 was normalized by only one, two or a combination of three reference miRNAs most stable. We obtained similar expression patterns in all combinations tested [Fig. 3B]. However, the relative

quantification of DGAT1 was overestimated at 35 DAF when only miR156-7 was used to normalize expression. Therefore, the use of one reference gene for normalizing will roughly estimate the expression of a gene of interest. So, additional reference genes (according to geNorm threshold of 0.15) are needed if accurate expression levels among different samples are required.

In the second case, DGAT1 was normalized by one, two and three most stable reference mRNAs. In contrast to normalization by miRNAs, DGAT1 did not show a similar expression pattern when one, two and three were used to normalize the expression of DGAT1 [Fig. 3C]. This test shows that normalization with improper reference genes can greatly affect the expression pattern of the target gene.

3. Conclusion

In conclusion, this is the first study in Brassicaceae family where miRNAs were evaluated for gene expression stability alongside other mRNA genes. During seed development, drastic morphological, biochemical and physiological changes are observed through the process, which globally affect the expression of several genes [31]. Due to these characteristics, it is very difficult to select optimal reference genes for RT-qPCR assays in seed tissues [5].

Here we provide evidence that miRNAs present higher expression stability than protein-coding genes, especially among *B.napus* seed samples of different development stages. The candidates miR156-7, miR11-1 and miR408-1 were identified as the three most suitable reference genes after geNorm analysis. Although the ranking of genes selected by geNorm and NormFinder were not the same, miRNAs showed a good stability in all cases. Based on the monitoring of gene expression pattern of DGAT1, we can concluded that miRNAs (miR156-7,miR11-1, miR408-1) are the most suitable set to be used as inner reference in gene in gene expression studies of the development of seeds.

4. Materials and methods

4.1 Plant material

B.napus (cultivar PFB-2, Embrapa) plants were grown in open field (30°S 51W) from April of 2011. Flowers, young leaves and siliques from different plants were collected in the middle of a light cycle at 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 63 days after flower opening (DAF). The seeds were dissected from the siliques, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

4.2 RNA extraction and cDNA synthesis

For each type of tissue/organ, four biological replicate samples were collected. Total RNA was extracted from each sample, and then reverse transcribed to cDNA samples. Total RNA was extracted using the NucleoSpin[®] RNA Plant (Macherey-Nagel, Germany) according to the manufacturer's protocol. RNase-free DNase set (Macherey-Nagel) was used to eliminate genomic DNA contamination of all the RNA samples. The quality was evaluated by electrophoresis on a 1.2% agarose gel. The cDNA synthesis was carried out by multiplex technique from approximately 1 μg of total RNA. Each reaction was primed with a pool of 2.3 μM 43 gene-specific stem-loop primers (IDT) and 1 μM oligonucleotide dT24V (Invitrogen). Before transcription, RNA and primers were mixed with RNase-free water to a total volume of 10 μL and incubated at 70°C for 5 min followed by ice cooling. Then, 6 μL 5x RT-Buffer (Promega), 3 μL of 5 mM dNTP (Ludwig) and 1,5 μL MML-V RT Enzyme 200 U (Promega) were added for a final volume of 30 μL . The synthesis was performed at 16°C for 30 min on a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystem), 37°C for 30 min and inactivation of the enzyme was completed at 85°C for 5 min. All cDNA samples were 100-fold diluted with RNase-free water before being used as a template in RT-qPCR analysis.

4.3 Selection of candidate housekeeping genes and primer design

Eight protein-coding genes, (*PP2A*, *TIP41*, *SAND*, *UP2*, *UBC21*, *ACT7*, *UBC9* and *UPI*), were selected based on previous reports of housekeeping genes for the *B. napus* [5] and other eight protein-coding genes were selected based on previous reports

of housekeeping in seeds from the peanut, tomato and *A. thaliana* [6, 29] [Supplementary Table 2]. The sequences used to design the primer pairs for protein-coding genes represent putative orthologs in *B. napus*. For that, sequences deposited in the *A. thaliana* Database (<http://www.arabidopsis.org>) were subjected to a Blastx against the NCBI Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and the respective coding sequences were retrieved for each ortholog. The 43 miRNAs were chosen based on previous gene expression studies in *B. napus* [15]. The stem–loop primers, used for miRNAs cDNA synthesis, were designed according to Chen et al [18], and consists of 43 conserved and 6 variable nucleotides that are specific to the 3′ end of the miRNA sequence (5′GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACNNNNN N 3′). The miRNA amplification primers were designed based on the fully tested miRNA sequence (forward), and the reverse primer was the universal reverse primer for miRNA (5′GTGCAGGGTCCGAGGT 3′).

4.4 Reverse transcription quantitative PCR

All quantitative PCR were performed in a CFX384 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) using SYBR Green I (Invitrogen) to detect double-strand cDNA synthesis. Reactions were done in a volume of 10 μ L containing 5 μ L of diluted cDNA (1:100), 0.1 X SYBR Green I (Invitrogen), 2,5 μ M dNTP, 1X PCR Buffer, 3 mM MgCl₂, 0.25 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), and 0.2 μ M of each reverse and forward primers. All samples were analyzed as technical quadruplicates with a no-template control also included. The PCR procedures were as follow: 95°C for 5 min, 40 cycles of 94°C for 15 s, 60°C for 10 s, then 72°C for 10 s, and melting curves were performed immediately after the completion of the RT-qPCR and fluorescence measured from 65 to 99°C. Threshold was manually determined using the CFX384 Manager Software (Bio-Rad).

4.5 Data analysis

Primer efficiency (E) and correlation coefficient (R^2) were calculated from the amplification curves using LinReg PCR [26]. The program determines baseline fluorescence and does a baseline subtraction. Then a Window-of-Linearity is set and PCR efficiencies per sample are calculated. The stability of reference gene expression

was analyzed with the geNorm [27] and NormFinder [28] softwares. The geNorm software determines a measure of gene expression stability (M value) and via a stepwise exclusion of the less stable gene creates a stability ranking. It also estimates the number of genes required to calculate a robust normalization factor (NF). It starts calculating the pairwise variation (V) $V_{2/3}$ between the NF2 (including the two most stable reference genes) and the normalization factor NF3 (including the three most stable reference genes). Then, it performs a stepwise calculation of the $V_{n/n+1}$ between the NF n and the NF $n+1$. NormFinder uses an ANOVA-based model to estimate intra and inter-group variation and combines these estimates to provide a direct measure of the variation in expression for each gene

Acknowledgements

This research was financially supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-CNPq, Brazilian Ministry of Education), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Genoprot-CNPq-MCT No. 559636/2009-1; (CNPq-Universal No. 472575/2011-2), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Agroestruturante-FAPERGS).

References

- [1] W.M. Freeman, J. Walker, K.E. Vrana, Quantitative RT-PCR : Pitfalls and Potential, *BioTechniques*. 26 (1999) 112-125.
- [2] A.M. Brunner, I.A. Yakovlev, S.H. Strauss, Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies, *BMC Plant Biol.* 4 (2004) 14.
- [3] S. Guénin, M. Mauriat, J. Pelloux, O. Van Wuytswinkel, C. Bellini, L. Gutierrez, Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references, *J. Exp. Bot.* 60 (2009), 487–493.
- [4] O. Thellin, W.Zorzi, B. Lakaye, B. De Borman, B.Coumans, Housekeeping genes as internal standards, use and limits, *J. Biotechnol.* 75 (1999) 291–295.

- [5] X. Chen, M. Truksa, S. Shah, R.J. Weselake, A survey of quantitative real-time polymerase chain reaction internal reference genes for expression studies in *Brassica napus*, *Anal. Biochem.* 405 (2010) 138–140.
- [6] B.J.W. Dekkers, L. Willems, G.W. Bassel, R.P.M. Van Bolderen-veldkamp, W. Ligterink, H.W.M. Hilhorst, L. Bentsink, Identification of Reference Genes for RT–qPCR Expression Analysis in Arabidopsis and Tomato Seeds, *Plant & Cell Physiology.* 53 (2012) 28–37.
- [7] L. Gutierrez, M. Mauriat, J. Pelloux, C. Bellini, O. Van Wuytswinkel, Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR, *Plant cell.* 20 (2008) 1734–1735.
- [8] N. Nicot, J.F. Hausman, L. Hoffmann, D. Evers, Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress, *J. Exp. Bot* 56 (2005) 2907–2914.
- [9] X. Chen, Small RNAs and their roles in plant development, *Annu. Rev. Cell Dev.* 25 (2009) 21–44.
- [10] O. Voinnet, Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs, *Cell.* 136 (2009) 669–687.
- [11] X. Lu, X. Huang, Plant miRNAs and abiotic stress responses, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368 (2008) 458–462.
- [12] M.D. Nodine, D.P. Bartel, MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis, *Genes Dev.* 24 (2010) 2678–2692.
- [13] M.R. Willmann, A.J. Mehalick, R.L. Packer, P.D Jenik, MicroRNAs Regulate the Timing of Embryo Maturation in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 155 (2011) 1871–1884.
- [14] Y.Q. He, Y. Wu, Oil body biogenesis during *Brassica napus* embryogenesis, *Journal of Integrative Plant Biology.* 51 (2009) 792–799.
- [15] A.P Körbes, R.D. Machado, F. Guzman, M.P. Almerão, L.F.V. De Oliveira, G. Loss-Morais, A.C. Turchetto-Zolet, A. Cagliari, F. Dos Santos Maraschin, M. Margis-Pinheiro, R. Margis, Identifying conserved and novel microRNAs in developing seeds of *Brassica napus* using deep sequencing, *PloS one.* 7 (2012) e50663.
- [16] T.Y. Zhao, M. Wang, S.X. Fu, W.C. Yang, C.K. Qi, X.J. Wang, Small RNA Profiling in Two Brassica napus Cultivars Identifies MicroRNAs with Oil Production- and Development-Related Expression and New Small RNA Classes, *Plant physiol.* 158 (2012), 813–823.

- [17] P.A. Davoren, R.E. McNeill, A.J. Lowery, M.J. Kerin, N. Miller, Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer, *BMC Mol. Biol.* 9 (2008) 76.
- [18] C. Chen, D.A. Ridzon, A.J. Broomer, Z. Zhou, D.H. Lee, J.T. Nguyen, M. Barbisin, N.L. Xu, V.R. Mahuvakar, M.R. Andersen, K.Q. Lao, K.J. Livak, K.J. Guegler, Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-qPCR, *Nucleic Acids Res.* 33(2005) e179.
- [19] J. Li, H. Wei, Y. Li, Q. Li, N. Li, Identification of a suitable endogenous control gene in porcine blastocysts for use in quantitative PCR analysis of microRNAs, *Science China. Life Sciences.* 55 (2012) 126–31.
- [20] C.R. Galiveti, T.S. Rozhdestvensky, J. Brosius, H. Lehrach, Z. Konthur, Application of housekeeping npcRNAs for quantitative expression analysis of human transcriptome by real-time PCR, *RNA* 16 (2009) 450–461.
- [21] H.J. Peltier, G.J. Latham, Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues, *RNA* 14 (2008) 844–852.
- [22] O. Timoneda, I. Balcells, S. Córdoba, A. Castelló, A. Sánchez, Determination of reference microRNAs for relative quantification in porcine tissues, *PloS one.* 7 (2012), e44413.
- [23] F.R. Kulcheski, F.C. Marcelino-Guimaraes, A.L. Nepomuceno, R.V. Abdelnoor, R. Margis, The use of microRNAs as reference genes for quantitative polymerase chain reaction in soybean, *Anal. Biochem.* 406 (2010) 185–192.
- [24] H. Feng, X. Huang, Q. Zhang, G. Wei, X. Wang, Z. Kang, Selection of suitable inner reference genes for relative quantification expression of microRNA in wheat, *Plant. Physiol. Biochem.* 51 (2012) 116–122.
- [25] C. Ramakers, J.M. Ruijter, R.H.L. Deprez, A.F. Moorman, Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data, *Neuroscience Letters.* 339 (2003) 62–66.
- [26] J.M. Ruijter, C. Ramakers, W.M.H. Hoogaars, Y. Karlen, O. Bakker, M.J.B. Van den Hoff, A.F.M. Moorman, Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) e45.
- [27] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.* 3 (2002) 1–11.
- [28] C.L. Andersen, J.L. Jensen, T.F. Ørntoft, 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 Res.* 64 (2004) 5245–5250.

[29] X. Chi, R. Hu, Q. Yang, X. Zhang, L. Pan, N. Chen, M. Chen, Z. Yang, T. Wang, Y. He, S. Yu, Validation of reference genes for gene expression studies in peanut by quantitative real-time RT-PCR, *Mol. Gen. Genom.* 287 (2012) 167–176.

[30] M.A. Troncoso-Ponce, A. Kilaru, X. Cao, T.P. Durrett, J. Fan, J.K. Jensen, N.A. Thrower, M. Pauly, C. Wilkerson, J.B. Ohlrogge, Comparative deep transcriptional profiling of four developing oilseeds, *Plant. J.* 68 (2011) 1014–1027.

[31] B.H. Le , C. Cheng, A.Q. Bui, J.A. Wagmaister, K.F. Henry, J.Pelletier, L.Kwong, M. Belmonte, R. Kirkbride, S.Horvath, G.N. Drews, R.L. Fischer, J.K. Okamuro, J.J. Harada, R.B. Goldberg, Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors, *Proc. Nati. Acad. Sci* 107 (2010), 8063–8070.

Figures

Fig. 1. Ranking of *B. napus* genes based on average expression stability values (M) after geNorm analysis, determined for the reference genes following stepwise exclusion of the least stable reference genes. (A) all 40 samples including different tissues and different stages of seed development; (B) eight different stages of seed development; (C) flowers samples; (D) leaves samples; (E) Optimal number of reference genes required for effective normalization in each of the situations by geNorm analysis.

Fig. 2. Norm Finder analysis the best 17 reference genes for each situation study. A lower stability value indicates more stable expression in all samples (A), different stages of seed development (B), flowers samples (C), leaves samples(D).

Fig. 3. Relative expression of DGAT1 in five different stages of seed development when normalized: (A) NF₂ (miR156-7 / miR408-1 / miR11-1) and NF₂ (PP2A / Ukn1 / ACT7) (B) DGAT1 was normalized to individual and/or combined miRNA reference genes;(C) DGAT1 was normalized to individual and/or combined mRNAs reference genes.

Supplementary files

Supplementary Table S1. Primer sequences and amplicon characteristics of 42 candidate reference genes tested for gene expression normalization.

Supplementary Table S2. All protein-coding genes used in this study.

Tables

Table 1. Primer sequences and amplicon characteristics of 17 best candidate reference genes used for gene expression normalization.

Reference gene	<i>Arabidopsis</i> annotation	Primers (F/R) <i>B. napus</i> (5'-3')	Amplicon length (bp)	T _m (°C)	Amplification efficiency (%)
<i>TIP 41</i>	TIP41-like family protein	AAAGGGGAGACACCCACAGT TCTGCTTAATCACCGGAAGC	145	84.38	2
<i>PP2A</i>	Regulatory subunit of protein phosphatase 2A	AGATCTGCATTGGCCTCAGT TCACTTGGTCAAGTTTGCTGA	151	85.03	1.95
<i>PEPKR1</i>	Phosphoenolpyruvate carboxylase related Kinase 1	AGCGACGACACAGAACAACA CTTCTTCTCGCGCTTCTC	119	85.24	1.93
<i>ACT7</i>	Actin	TTCAATGTCCCTGCCATGTA GAGACGGAGGATAGCGTGAG	156	84.28	1.98
<i>UBC 9</i>	Ubiquitin conjugating enzyme 9	ATTTCCAAGGTGCTGCTGTC GTGTCAGCCCATTCCGTA	156	84.69	1.96
<i>UBC 21</i>	Ubiquitin conjugating enzyme 21	GTGCGCTTCTTGACAAAAT CCTCAGGATGAGCCATCAGT	148	84.98	1.96
<i>UKN1</i>	Unknown protein	CGTTGGAGTTTCCACAACCT ACCCGCCATACAACAAGTC	121	84.23	2
<i>UP 1</i>	Unknown protein	CCCATCTGAGTTTGGTTGCT ACCTGAAACCCATGGAACAA	166	85.24	1.86
<i>UP 2</i>	Unknown protein	CCGCGTTTCATATCCTTCTC TCATACTCTGGGCCGATTTT	153	85.57	1,93
<i>miR11-1</i>	miRNA	TGCGGCAACCAACGAACATG GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.34	1.87
<i>miR156-3_3</i>	miRNA	TGCTCACTGCTCTTCTGTGAGA GTGCAGGGTCCGAGGT	73	81.55	1.96
<i>miR156-7</i>	miRNA	TGACAGAAGAGAGAGAGCAC GTGCAGGGTCCGAGGT	70	80.49	1.94
<i>miR159_1</i>	miRNA	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.13	1.92
<i>miR167-1_2</i>	miRNA	TGAAGCTGCCAGCATGATCTA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.56	1.88
<i>miR168_1</i>	miRNA	TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	80.78	1.82
<i>miR408-1</i>	miRNA	ACAGGGAACAAGCAGAGCATG GTGCAGGGTCCGAGGT	71	80.73	1.84
<i>miR824-1</i>	miRNA	TAGACCATTTGTGAGAAGGGA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.47	1.89

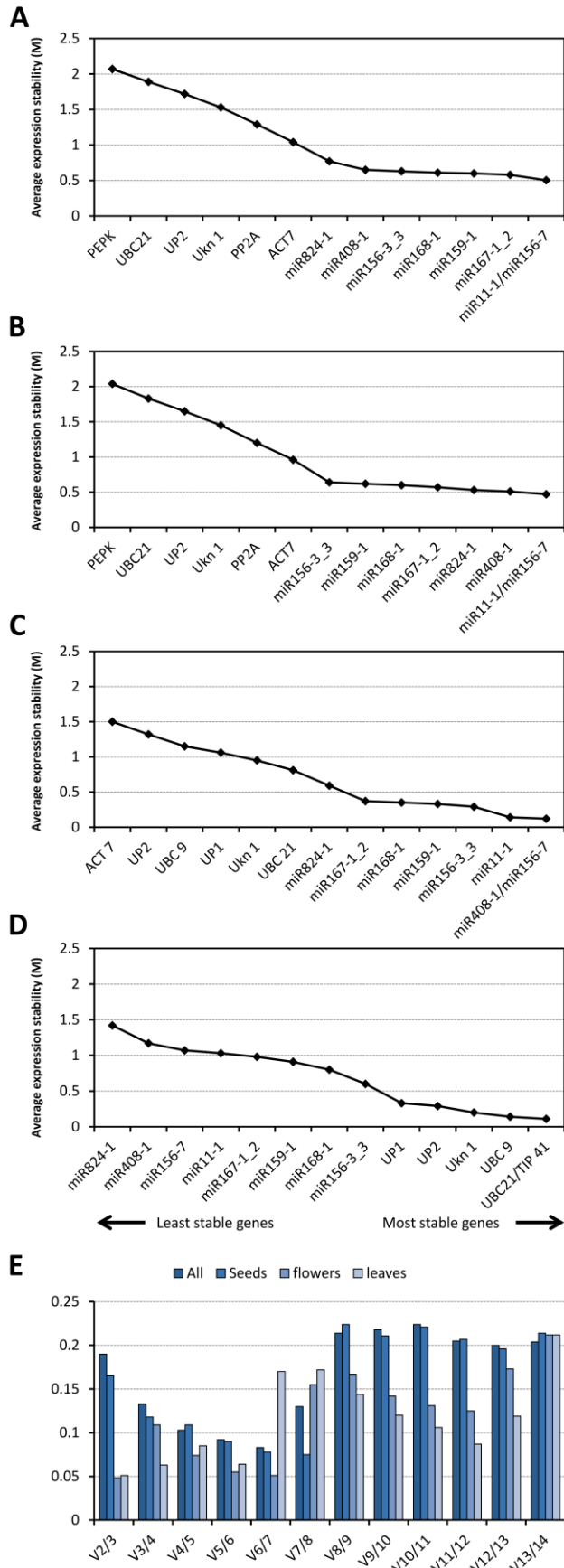


Figure-1

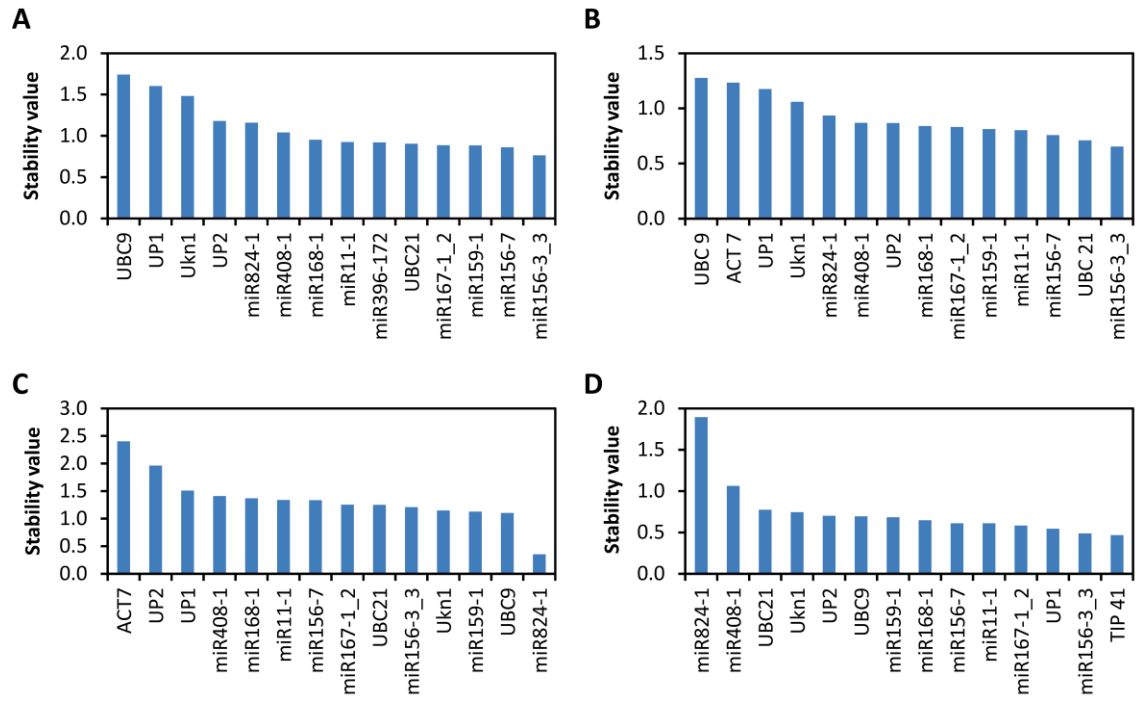


Figure-2

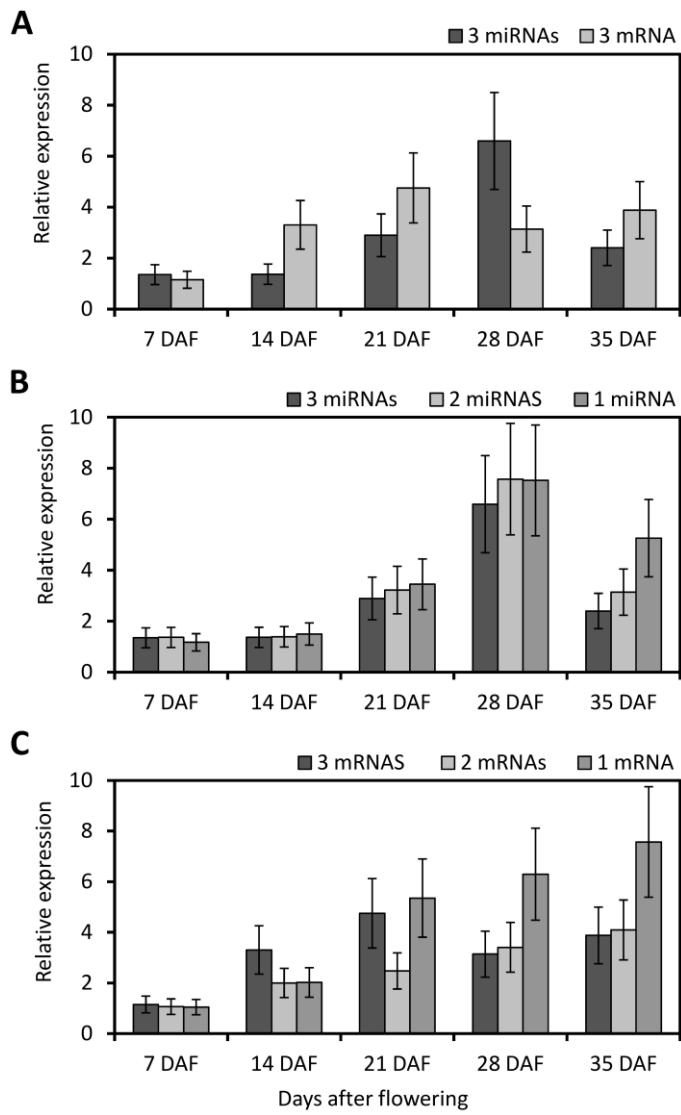


Figure-3

Table S1: Primer sequences and amplicon characteristics of 42 best candidate reference genes used for gene expression normalization.

Internal Reference	Function	Primers (F/R) <i>B. napus</i> (5'-3')	Amplicon length (bp)	T _m (°C)	Amplification efficiency (%)	R ²
miR393-1_1	miRNA	ATCATGCGATCTCATTGGATT GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.34	1.96	0.993
miR167-2_6	miRNA	TGAAGCTGCCAGCATGATCTAT GTGCAGGGTCCGAGGT	72	81.46	1.74	0.964
miR156-1_10	miRNA	GCTCACTGCTCTATCTGTCAGG GTGCAGGGTCCGAGGT	72	80.45	1.93	0.982
miR02_2	miRNA	AGCCTGGCTCTGATACCATGAAGT GTGCAGGGTCCGAGGT	74	81.56	1.85	0.995
miR169_104	miRNA	GGCAAGTTGTCCTTCGGCTACA GTGCAGGGTCCGAGGT	72	80.35	1.89	0.994
miR06_1	miRNA	TCGTCTGATACTAATGGGTCA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.67	1.9	0.994
miR07-2_1	miRNA	AGTTCAGATGCTGTGAGCGGC GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.56	1.92	0.995
miR403_187	miRNA	TTAGATTCACGCACAAACTCG GTGCAGGGTCCGAGGT	71	80.78	1.96	0.998
miR05_1	miRNA	TAAGTATCCCTATAGTTCTGA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.45	1.86	0.993
miR08_1	miRNA	TGTGGCTTTAACATCTTAACTA GTGCAGGGTCCGAGGT	72	80.95	1.83	0.988
miR07-1_1	miRNA	CGCTCACAGCATCTGAACTCT GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.26	1.9	0.982
miR168_4	miRNA	TTCGCTTGGTGCAGGTCGGGA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.67	1.96	0.997
miR04_1	miRNA	TTTTGCGTTTCAACTCGGTCC GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.78	1.94	0.994

miR156-3_4	miRNA	GCTCACTGCTCTTTCTGTCAG GTGCAGGGTCCGAGGT	71	80.96	1.92	0.992
miR156-1_11	miRNA	TGCTCACTGCTCTATCTGTCAG GTGCAGGGTCCGAGGT	72	81.67	1.83	0.984
miR1140_1	miRNA	ACAGCCTAAACCAATCGGAG GTGCAGGGTCCGAGGT	70	80.67	1.89	0.991
miR03_1	miRNA	TCCACCCATACCATACAGACCC GTGCAGGGTCCGAGGT	72	81.49	1.91	0.998
miR156-1_1	miRNA	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC GTGCAGGGTCCGAGGT	70	80.56	1.95	0.989
miR396-172	miRNA	TTCAATAAAGCTGTGGGAAG GTGCAGGGTCCGAGGT	70	80.78	1.93	0.986
miR824-2	miRNA	CCTTCTCATCGATGGTCTAGA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.72	1.82	0.997
miR156-2_2	miRNA	GCTCACTGCTTTATCTGTCAGA GTGCAGGGTCCGAGGT	72	81.05	1.95	0.994
miR156-4_1	miRNA	TTGACAGAAGAAAGAGAGCAC GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.83	1.83	0.994
miR158-12	miRNA	CTTTGTCTATCGTTTGGAAAA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.38	1.86	0.983
miR158-16	miRNA	TTTGTCTATCGTTTGGAAAAG GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.11	1.69	0.958
miR164-51	miRNA	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	80.9	1.74	0.931
miR393-1_2	miRNA	TCCAAAGGGATCGCATTGATCC GTGCAGGGTCCGAGGT	72	81.34	1.78	0.948
miR167-1_1	miRNA	TGAAGCTGCCAGCATGATCTA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	80.75	1.88	0.988
miR172_1	miRNA	GCATCATCTTCAAGATTCAGA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.75	1.72	0.959

miR319_130	miRNA	TTGGA CTGAAGGGAGCTCCTT GTGCAGGGTCCGAGGT	71	80.23	1.63	0.945
miR319-132	miRNA	TTTGGACTGAAGGGAGCTCCT GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.73	1.95	0.989
miR390_144	miRNA	AAGCTCAGGAGGGATAGCGCC GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.72	1.93	0.986
miR09-1	miRNA	TAATGGTGATTTTGAATCTAA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.73	1.67	0.953
miR396-164	miRNA	TCCACAGCTTTCTTGAACTT GTGCAGGGTCCGAGGT	71	80.83	1.72	0.957
miR01-1_1	miRNA	ATAAATCCCAAGCATCATCCA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.49	1.85	0.991
miR400-185	miRNA	TATGAGAGTATTATAAGTCAC GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.61	1.75	0.943
TUA5	alpha tubulin	GCGTGTTGTTTGATGTACCG ACAACCGTTGGAGGTTGGTA	149	84.67	1.83	0.995
UKN2	Unknown protein	ACAAGGCACAAACCCTCAAG ATTTTGGCTGCAACAAATCC	147	84.46	1.99	0.982
ASAR 2	ARF-Like GTPase	GCAGGGTCTGGAAGGATTAC AGGGAACGGTGGCTAGAGAT	138	84.21	1.96	0.994
TPR-1	Tetratricopeptid-like	GCGAAACATGCACGATAAAG GATTCTCTATGGGCTCTCG	143	84.44	1.98	0.995
MTP	Metalloprotease, insulin	ACCACCAAGATGGCTCAAAC AGTTGGTAAAAGGTGGGTTG	139	84.02	1.91	0.984
HDC	Nuclear helicase	GACGGCAGAAGGGAAGTCTA CACGCAGATACACTTTGTTTCG	118	84.12	1.82	0.982
SAND	SAND-family protein	GGGACCCCAAGACTCAAT TTTTACCCTCTGGCACACCT	151	85.22	2	0.995

Table S2: All protein-coding genes used in this study

protein-coding gene	<i>Arabidopsis</i> annotation	Accession No. of <i>B. napus</i> EST
TUA5	alpha tubulin	GR459920
UKN1	Unknown protein	EV176275
UKN2	Unknown protein	EL627436
ASAR 2	ARF-Like GTPase	CD814222
TPR-1	Tetratricopeptid-like	EV064335
MTP	Metalloprotease, insulin	ES905302
HDC	Nuclear helicase	EV015794
PEPKR1	Phosphoenolpyruvate carboxylase related Kinase 1	DY023896
ACT7	Actin	EV116054
UBC 21	Ubiquitin conjugating enzyme 21	EV086936
PP2A	Regulatory subunit of protein phosphatase 2A	EV051005
TIP 41	TIP41-like family protein	EV222761
UBC 9	Ubiquitin conjugating enzyme 9	EV002123
SAND	SAND-family protein	EV084276
UP 1	Unknown protein	EE450388
UP 2	Unknown protein	EV116750
DGAT1	Diacylglycerol acyltransferase 1	AF164434

CAPÍTULO II - Expressão de microRNAs durante o desenvolvimento de sementes de *Brassica napus* e predição de possíveis genes alvos envolvidos no metabolismo lipídico

1. Introdução

Plantas oleaginosas, produtoras de óleos em sementes, são importantes fontes de ácidos graxos para a nutrição humana, além de fornecer cadeias de hidrocarbonetos para a fabricação de produtos industriais. A produção mundial de óleo de origem vegetal foi aproximadamente 100 bilhões de quilos em 2012 (USDA 2012). Grande parte do óleo produzido em sementes de plantas, tais como soja, canola, girassol e óleo de palma são armazenados na forma de triacilglicerol (TAG), sendo esta a principal fonte de carbono e energia para o estabelecimento de plântulas após a germinação. *Brassica napus* (canola) é a terceira cultura oleaginosa mais produzida no mundo, fornecendo aproximadamente 16% do total de óleo produzido (www.faostat.fao.org). Devido à importância econômica do óleo de sementes de *B. napus*, é necessário entender os processos regulatórios que coordenam a maturação de sementes, especialmente a acumulação de óleo na forma de TAG. Desta forma, a regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário e maturação de sementes desta espécie oleaginosa é ainda objeto de numerosos estudos (Troncoso-Ponce et al., 2011).

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs (19-25 nt) que desempenham funções importantes na regulação da expressão gênica em níveis transcricionais e pós-transcricionais (Carthew and Sontheimer, 2009). Estudos em células de hepatócitos de humanos demonstraram que miRNAs são componentes importantes no metabolismo lipídico, desempenhando um papel na regulação da biossíntese de ácidos graxos e acúmulo de (TAG). Células de HepG2 transfectadas com construções superexpressando ou silenciando o miRNA-370 ou miR-122 apresentaram alterações na expressão de genes chaves para a biossíntese de ácidos graxos e acúmulo de triacilgliceróis como, por exemplo SREBP-1c, DGAT2, FAS, ACC1 (Iliopoulos et al., 2010). Em plantas, um crescente número de pesquisas com o objetivo de elucidar a atuação dos miRNAs no processo de maturação e possivelmente no metabolismo lipídico em sementes, foi realizada por diversos grupos de pesquisa (Song et al., 2011; Huang et al., 2013). Estudos em *Arabidopsis thaliana* demonstraram que um conjunto de miRNAs e seus alvos estão envolvidos na embriogênese, enquanto que um conjunto diferente de miRNAs pode atuar no processo de maturação de sementes, regulando direta ou indiretamente genes do metabolismo lipídico (Nordine and Bartel, 2010; Willmann et al.,

2011). Recentemente, os avanços nas tecnologias de sequenciamento e a disponibilidade de ferramentas de bioinformática têm contribuído para a identificação de pequenos RNAs não codificantes, especialmente miRNAs. Através do sequenciamento de pequenos RNAs foi possível identificar a diversidade e estimar a abundância de miRNAs presentes durante o desenvolvimento de sementes em *B. napus* (Körbes et al., 2012; Wang, 2012). Huang e colaboradores analisaram o padrão de expressão de miRNAs através do sequenciamento de pequenos RNAs e observaram que miRNAs possuem um padrão de expressão temporal durante a maturação de sementes de *B. napus*. (Huang et al., 2013).

Em plantas, os miRNAs apresentam alta complementaridade com regiões específicas de seus alvos, permitindo a predição de genes alvos através da utilização de algoritmos computacionais (Voinnet, 2009; Dai et al., 2011). Estudos em *B.napus* demonstraram através de predições computacionais e experimentos de sequenciamento de degradoma de mRNA, que miRNAs podem atuar na regulação negativa de genes-chaves para a maturação de sementes (Körbes et al., 2012; Wang, 2012). Os fatores de transcrição da família NF-YA, que atuam como reguladores-chaves do processo de maturação de sementes, foram validados experimentalmente por sequenciamento de degradoma como genes-alvo de diversos membros da família miR169 em *A thaliana* (Li et al., 2008). Na espécie *B. napus*, os genes que codificam os fatores da família NF-YA também foram identificados como alvos de membros da família miR169 (Xu et al., 2012). Estes resultados indicam que a via de regulação negativa miR169/NF-YA pode ser determinante no processo de maturação de semente .

Outros miRNAs podem estar envolvidas na regulação de genes envolvidos no processo de maturação de sementes e metabolismo lipídico. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo analisar o padrão de expressão de miRNAs por RT-qPCR durante diferentes estágios do desenvolvimento de sementes de *B. napus*. Além disso, através do uso de ferramentas de bioinformática, foi possível prever uma série de possíveis genes alvos de miRNAs de *B. napus* envolvidos nos processos de biossíntese de ácidos graxos e acúmulo de lipídios durante o desenvolvimento de sementes.

2. Material e Métodos

2.1 Predição de genes-alvos envolvidos no metabolismo lipídico

Realizamos um Blastx utilizando o programa CLC-Bio para encontrar sequencias de aminoácidos que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico. Foi feito um Blastx entre as sequencias de aminoácidos de proteínas de *A. thaliana* relacionadas ao metabolismo lipídico, disponíveis no bando de dados *Aralip* (www.aralip.plantbiology.msu.edu/pathways), contra o banco de dados de sequencias de cDNA de *B. napus* traduzidas para sequencia de aminoácidos disponível em nosso laboratório. Um total de 229 miRNAs (incluindo as isoformas) identificados por Korbes e colaboradores, foram utilizados para o alinhamento contra o banco de dados de sequencias de cDNA de *B. napus* enriquecidos para genes envolvidos no metabolismo lipídico utilizando o programa online psRNATarget (Dai and Zhao, 2011). Foram preditos como alvos, os transcritos que tiveram cinco ou menos mismatches com um determinado miRNA, sendo que o pareamento G:U é contado pelo psRNATarget como 0.5 mismatch. Novamente BLASTx foi utilizado para anotação das sequências candidatas com base na sua similaridade de sequências com genes previamente identificados e anotados, que estão depositados no bancos de dados de proteínas Swiss-Prot/Uniprot. Esta análise foi conduzida utilizando o programa blast2GO v2. 3,5. A anotação foi melhorada através da análise de domínios conservados utilizando o programa InterProScan.

2.2 Material vegetal

Sementes de canola da cultivar PFB-2-Embrapa foram semeadas em abril de 2011 em campo aberto na cidade de Porto Alegre. Esta cultivar, cujas flores são amarelas, é de polinização aberta, ciclo longo, de aproximadamente 160 dias. As flores de diferentes plantas foram marcadas a partir da abertura floral e as sementes foram coletas em todos os estágios de desenvolvimento pré-determinados: (7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 63 dias após abertura floral) no período de setembro a dezembro de 2011. Após a coleta, as amostras foram armazenadas imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas no ultrafreezer a -80°C.

2.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

RNA total foi extraído de todas as amostras utilizando o kit NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel, Germany) de acordo com o protocolo do fabricante. Para a remoção do DNA genômico, as amostras foram tratadas com 1µl de DNase fornecida pelo Kit utilizado. Em seguida, a integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1.2%. A concentração e pureza do RNA foram avaliadas por espectrofotometria de absorção, utilizando o equipamento NanoDrop Life Spectrophotometer. Um subconjunto de 30 miRNAs identificados como diferencialmente expressos em análises de expressão por RNA-seq e 10 novos miRNAs inéditos em *B. napus* (Körbes et al., 2012), foram analisados por RT-qPCR. A transcrição reversa de cada miRNA foi feita utilizando 43 oligonucleotídeos stem-loop. Para as reações de PCR em tempo real foram utilizados oligonucleotídeo direto individual e oligonucleotídeo reverso universal. O oligonucleotídeo stem-loop usado na síntese de cDNA foi desenhado de acordo com (Chen et al., 2005), consistindo em 44 nt fixos que formam uma haste (dois braços pareados) e uma alça, e seis nucleotídeos no terminal 3' complementares aos seis nucleotídeos do terminal 3' do miRNA correspondente(5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATAC GACNNNNNN 3'). O oligonucleotídeo direto específico, em geral, é idêntico à sequência completa do miRNA, e o oligonucleotídeo reverso universal (5' GTGCAGGGTCCGAGGT 3') usado em todas as reações de qPCR foi baseado na sequência fixa do oligonucleotídeo stem-loop (Chen et al., 2005). Os oligonucleotídeo stem-loop de todos os miRNAs a serem testados foram agrupados em uma mesma reação, para a síntese de cDNA multiplex, que ocorreu em duas etapas: I) anelamento dos oligonucleotídeos stem-loop com 1 µL de RNA total (entre 500 e 100 ng) a 70° C por 5 min; II) síntese da primeira fita de cDNA com a transcriptase reversa M-MLV, nas condições de 16°C por 30 min, 42° C por 30 min, 85° C por 5 min e 10°C por 10 min.

2.4 Reações de PCR quantitativa (RT-qPCR)

Foram utilizados 40 oligonucleotídeos diretos para a amplificação do conjunto de miRNAs selecionados. As reações de RT-qPCR foram realizadas em um aparelho de PCR em tempo real CFX384 Real-Time (Bio-Rad) usando SYBR Green I (Invitrogen) para detectar a síntese do produto de amplificação. As reações foram feitas em um volume final de 10 µL contendo 5 µL de cDNA diluído (1:100), 0.1x SYBR Green I (Invitrogen), 3 mM de MgCl₂, 2,5 µM de dNTP, Tampão de PCR 1x, 0.25 U de DNA Polimerase Platinum Taq (Invitrogen) e 0.2 µM de cada oligonucleotídeo, direto e reverso. As amostras utilizadas nas reações de RT-qPCR foram analisadas na forma de quadruplicatas biológicas. Em cada uma das placas de 384 poços, foram incluídas quadruplicatas técnicas e controles negativos. Para a normalização dos dados foram utilizados os “CTs” dos miRNAs: miR156-7, miR408-1 e miR11-1, os quais foram os mais estáveis entre estas amostras, de acordo com as análises do programa geNorm (Andersen et al., 2004). As condições de amplificação foram as seguintes: uma etapa inicial de ativação da polimerase por 5 minutos a 95°C, 40 ciclos para 15 segundos a 95°C (desnaturação), 10 segundos a 60°C (anelamento) e 10 segundos a 72°C (elongação). Uma análise de curva de desnaturação foi programada para o fim da reação de PCR com aumento da temperatura de 65-99°C. As linhas de *threshold* foram determinadas manualmente, em uma região correspondendo à faixa linear da curva de amplificação logarítmica, sendo fixadas em um ΔR_n de 200 para todas as reações, usando o programa CFX Manager. Para calcular a expressão relativa dos miRNAs, foi usado o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Os resultados foram submetidos a testes de ANOVA para determinar os miRNAs que variaram significativamente entre todos os estágios de desenvolvimentos, além do teste tukey para comparar diferenças na expressão par a par. As médias foram consideradas significativamente diferentes quando $P < 0.05$.

3 Resultados e discussão

3.1 Predição de possíveis genes-alvo de microRNAs envolvidos no metabolismo lipídico

Primeiramente, foi estabelecida uma estratégia para a busca de possíveis genes-alvo relacionados ao metabolismo lipídico. Para os miRNAs selecionados foi realizada a predição *in silico* de alvos envolvidos no metabolismo lipídico (Figura 1). A família 156 foi a mais representada entre todas as famílias utilizadas nesta abordagem. Após análise do psRNAtarget (versão 1.6), foram preditos 481 possíveis genes-alvo (redundantes) para 104 sequências únicas maduras de miRNAs de *B. napus*. *Contigs* de potenciais alvos de 125 miRNAs não apresentaram anotação nos bancos de dados utilizados neste estudo. Alguns dos alvos preditos são alvos já comprovados em outras espécies e em *B. napus*. Foram encontrados 135 *contigs* únicos preditos como potenciais alvos dos miRNAs analisados (Tabela 1). Em alguns casos um único miRNA apresentou diferentes alvos de diferentes rotas metabólicas. Por exemplo, miR156-2_2 apresentou a predição de genes que codificam enzimas que atuam na degradação de lipídios (monoglicerídio lípase) além de enzimas envolvidas no estoque de TAG nas células (oleosinas) (Tabela1).

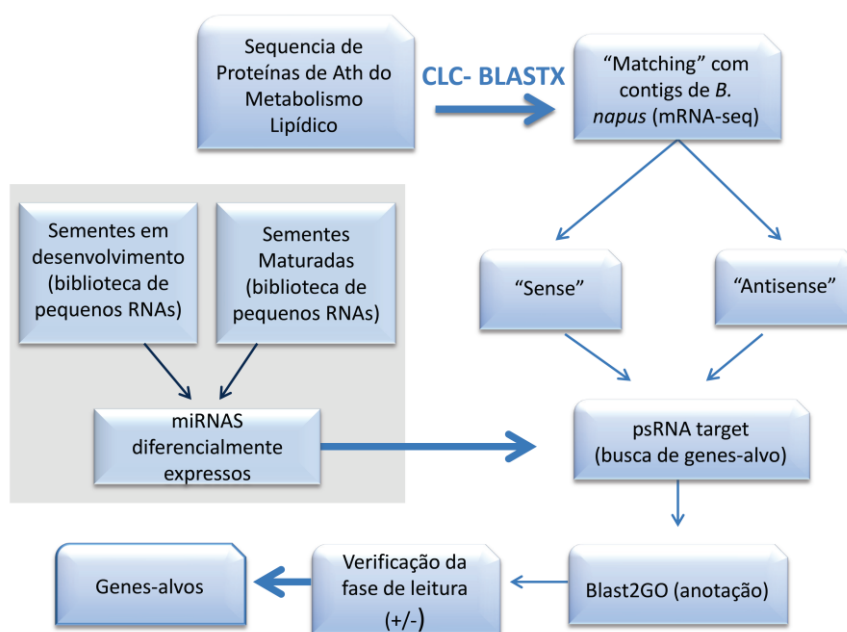


Figura 1- Representação esquemática da estratégia adotada para a busca de genes-alvos envolvidos no metabolismo lipídico.

Tabela 1- Predição de genes envolvidos no metabolismo lipídico que são alvos de miRNA conservados e de miRNAs novos em *B. napus*.

miRNA	Inibição	Função predita dos genes alvo
miR01-1_1	Clivagem	lipase class 3 family protein
miR01-1_1	Tradução	pentatricopeptide repeat-containing protein
miR01-1_1	Tradução	snf2 and helicase domain-containing protein
miR02_2	Clivagem	patatin-like phospholipase domain-containing protein
miR02_2	Clivagem	protein
miR02_2	Clivagem	protein
miR02_2	Clivagem	protein wax2-like
miR03_1	Clivagem	leucine-rich repeat protein kinase-like protein
miR04_1	Tradução	dna repair and recombination protein
miR04_1	Tradução	multidrug pheromone mdr abc transporter family
miR05_1	Tradução	isovaleryl- dehydrogenase
miR05_1	Tradução	leucine-rich repeat protein kinase-like protein
miR07-1_1	Clivagem	isovaleryl- dehydrogenase
miR07-1_1	Clivagem	udp-d-glucose udp-d-galactose 4-epimerase 1
miR07-1_1	Clivagem	udp-d-glucose udp-d-galactose 4-epimerase 1
miR07-2_1	Clivagem	snf2 and helicase domain-containing protein
miR08_1	Tradução	at1g74630-like protein
miR08_1	Tradução	b3 domain-containing protein os07g0679700-like
miR08_1	Tradução	ethylene-responsive transcription factor 5
miR08_1	Tradução	hypoxia up-regulated protein 1-like
miR08_1	Tradução	sequence-specific dna binding transcription factor
miR09_1	Clivagem	abc transporter g family member 22
miR09_1	Clivagem	ca2+-transporting atpase
miR09_1	Clivagem	chlorophyll b reductase
miR09_1	Clivagem	rav-like b3 domain dna binding protein
miR09_1	Clivagem	snf2 domain-containing protein
miR1140_1	Clivagem	oleosin-like protein
miR1140_1	Tradução	pyruvate dehydrogenase e1 alpha subunit
miR1140_1	Tradução	pyruvate dehydrogenase e1 alpha subunit
miR1140_2	Tradução	protein reticulata-related 1
miR1140_2	Clivagem	pyruvate dehydrogenase e1 alpha subunit
miR1140_3	Clivagem	oleosin-like protein
miR1140_3	Tradução	pyruvate dehydrogenase e1 alpha subunit
miR1140_3	Tradução	pyruvate dehydrogenase e1 alpha subunit
miR1140_4	Tradução	protein reticulata-related 1
miR156_18	Clivagem	at3g01460-like protein
miR156_18	Clivagem	nuclear matrix constituent protein 1-like
miR156_18	Clivagem	protein
miR156_18	Clivagem	protein

miR156_18	Clivagem	tryptophan synthase beta-subunit
miR156_20	Tradução	esterase lipase thioesterase family protein
miR156_20	Tradução	exocyst complex component 7
miR156_20	Clivagem	glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein mfp-a
miR156_20	Tradução	monoglyceride lipase
miR156_20	Tradução	monoglyceride lipase
miR156_20	Clivagem	rossmann-fold nad -binding domain-containing protein
miR156_20	Clivagem	white-brown-complex abc transporter family
miR156_4	Tradução	arp protein
miR156_4	Clivagem	protein
miR156_4	Clivagem	rna recognition motif-containing protein
miR156_4	Clivagem	set domain protein
miR156_4	Clivagem	short chain alcohol
miR156_4	Clivagem	unnamed protein product [Vitis vinifera]
miR156_5	Tradução	lipid phosphate phosphatase 3
miR156_5	Tradução	rna helicase
miR156_5	Tradução	rna recognition motif-containing protein
miR156_5	Clivagem	short-chain dehydrogenase reductase family protein
miR156_5	Clivagem	white-brown-complex abc transporter family
miR156_7	Clivagem	acetyl- cytosolic 2
miR156_7	Clivagem	carboxytransferase beta subunit
miR156_7	Clivagem	protein
miR156_7	Tradução	rna helicase
miR156_7	Clivagem	short chain alcohol
miR156_7	Clivagem	unnamed protein product [Vitis vinifera]
miR156-1_1	Clivagem	at5g46290 mpl12_7
miR156-1_1	Clivagem	early-responsive to dehydration stress-related protein
miR156-1_1	Tradução	protein
miR156-1_1	Tradução	ring fyve phd zinc finger protein
miR156-1_1	Clivagem	rna recognition motif-containing protein
miR156-1_1	Clivagem	rna recognition motif-containing protein
miR156-1_1	Clivagem	short chain alcohol
miR156-1_1	Clivagem	stearoyl acp thioesterase
miR156-1_1	Clivagem	unnamed protein product [Vitis vinifera]
miR156-1_10	Clivagem	annotation was added to scaffolds in november 2011-long chain fatty acid- ligase
miR156-1_10	Tradução	esterase lipase thioesterase family protein
miR156-1_10	Tradução	exocyst complex component 7
miR156-1_10	Clivagem	glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein mfp-a
miR156-1_10	Tradução	monoglyceride lipase
miR156-1_10	Tradução	monoglyceride lipase
miR156-1_10	Clivagem	rossmann-fold nad -binding domain-containing protein
miR156-1_10	Clivagem	white-brown-complex abc transporter family
miR156-1_11	Clivagem	alpha beta-hydrolase domain-containing protein

miR156-1_11	Clivagem	chloroplast omega-6 fatty acid desaturase
miR156-1_11	Clivagem	embryo-specific protein 1
miR156-1_11	Clivagem	esterase lipase thioesterase family protein glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein
miR156-1_11	Clivagem	mfp-a
miR156-1_11	Clivagem	kinesin family member 11
miR156-1_11	Tradução	monoglyceride lipase
miR156-1_11	Tradução	monoglyceride lipase
miR156-1_11	Clivagem	rossmann-fold nad -binding domain-containing protein
miR156-1_12	Clivagem	embryo-specific protein 1
miR156-1_12	Clivagem	esterase lipase thioesterase family protein glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein
miR156-1_12	Clivagem	mfp-a
miR156-1_12	Tradução	monoglyceride lipase
miR156-1_12	Tradução	monoglyceride lipase
miR156-1_12	Clivagem	rossmann-fold nad -binding domain-containing protein
miR156-1_13	Clivagem	at1g67120
miR156-1_13	Tradução	esterase lipase thioesterase family protein
miR156-1_13	Tradução	exocyst complex component 7 glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein
miR156-1_13	Clivagem	mfp-a
miR156-1_13	Tradução	monoglyceride lipase
miR156-1_13	Tradução	monoglyceride lipase
miR156-1_13	Tradução	protein
miR156-1_13	Clivagem	rossmann-fold nad -binding domain-containing protein
miR156-1_13	Clivagem	white-brown-complex abc transporter family
miR156-1_3	Clivagem	early-responsive to dehydration stress-related protein
miR156-1_3	Tradução	protein
miR156-1_3	Clivagem	rna recognition motif-containing protein
miR156-1_3	Clivagem	rna recognition motif-containing protein
miR156-1_3	Clivagem	short chain alcohol
miR156-1_3	Clivagem	stearoyl acp thioesterase
miR156-1_3	Clivagem	unnamed protein product [Vitis vinifera]
miR156-1_6	Tradução	lipid phosphate phosphatase 3
miR156-1_6	Clivagem	lmb1-like membrane protein
miR156-1_6	Tradução	lysocardiolipin and lysophospholipid acyltransferase
miR156-1_6	Tradução	protein
miR156-1_6	Tradução	rna recognition motif-containing protein
miR156-1_6	Clivagem	short chain alcohol
miR156-1_6	Clivagem	unnamed protein product [Vitis vinifera]
miR156-2_2	Clivagem	acetyl- carboxylase 1
miR156-2_2	Clivagem	esterase lipase thioesterase family protein
miR156-2_2	Clivagem	esterase lipase thioesterase family protein glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein
miR156-2_2	Clivagem	mfp-a
miR156-2_2	Clivagem	glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein
miR156-2_2	Clivagem	mfp-a

miR156-2_2	Clivagem	glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein mfp-a
miR156-2_2	Tradução	monoglyceride lipase
miR156-2_2	Tradução	monoglyceride lipase
miR156-2_2	Clivagem	oleosin 2
miR156-2_2	Clivagem	protein
miR156-2_5	Clivagem	acyl- thioesterase family protein
miR156-2_5	Clivagem	at1g74630-like protein
miR156-2_5	Tradução	lipid phosphate phosphatase 3
miR156-2_5	Tradução	protein
miR156-2_5	Clivagem	protochlorophyllide reductase c
miR156-2_5	Clivagem	protochlorophyllide reductase c
miR156-2_5	Clivagem	rna recognition motif-containing protein
miR156-2_5	Clivagem	stearoyl acp thioesterase
miR156-2_5	Clivagem	unnamed protein product [Vitis vinifera]
miR156-2_6	Clivagem	abc transporter
miR156-2_6	Clivagem	esterase lipase thioesterase family protein
miR156-2_6	Clivagem	esterase lipase thioesterase family protein
miR156-2_6	Tradução	exocyst complex component 7
miR156-2_6	Tradução	fatty acid elongase 3-ketoacyl- synthase 1
miR156-2_6	Clivagem	glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein mfp-a
miR156-2_6	Clivagem	glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein mfp-a
miR156-2_6	Clivagem	glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein mfp-a
miR156-2_6	Clivagem	mfp-a
miR156-2_6	Tradução	monoglyceride lipase
miR156-2_6	Tradução	monoglyceride lipase
miR156-2_6	Tradução	multidrug pheromone mdr abc transporter family
miR156-2_6	Clivagem	oleosin 2
miR156-2_6	Clivagem	protein
miR156-3_3	Tradução	di-glucose binding protein with kinesin motor domain
miR156-3_3	Clivagem	esterase lipase thioesterase family protein
miR156-3_3	Clivagem	glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein mfp-a
miR156-3_3	Clivagem	mfp-a
miR156-3_3	Clivagem	-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
miR156-3_4	Tradução	esterase lipase thioesterase family protein
miR156-3_4	Tradução	exocyst complex component 7
miR156-3_4	Clivagem	glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein mfp-a
miR156-3_4	Clivagem	mfp-a
miR156-3_4	Clivagem	-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
miR156-3_4	Tradução	protein
miR156-3_4	Tradução	protein
miR156-3_4	Tradução	transcription factor
miR156-3_6	Tradução	esterase lipase thioesterase family protein
miR156-3_6	Tradução	exocyst complex component 7
miR156-3_6	Clivagem	glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein

		mfp-a
miR156-3_6	Clivagem	-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
miR156-3_6	Tradução	protein
miR156-3_6	Tradução	transcription factor
miR156-3_7	Clivagem	esterase lipase thioesterase family protein glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein
miR156-3_7	Clivagem	mfp-a
miR156-3_7	Clivagem	-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
miR156-4_1	Clivagem	3-ketoacyl- synthase
miR156-4_1	Tradução	oleosin-like protein
miR156-4_1	Clivagem	phd finger family protein
miR156-4_1	Tradução	rna helicase
miR156-4_1	Clivagem	rna recognition motif-containing protein
miR156-4_1	Clivagem	sequence-specific dna binding transcription factor
miR156-4_2	Clivagem	cell division cycle protein 48 homolog
miR156-4_2	Clivagem	cell division cycle protein 48 homolog
miR156-4_2	Tradução	oleosin-like protein
miR156-4_2	Clivagem	phd finger family protein
miR156-4_2	Tradução	rna helicase
miR156-4_2	Clivagem	rna recognition motif-containing protein
miR156-4_2	Tradução	short chain alcohol
miR156-4_3	Tradução	oleosin-like protein
miR156-4_3	Clivagem	phd finger family protein
miR156-4_3	Tradução	rna helicase
miR156-4_3	Clivagem	rna recognition motif-containing protein
miR156-4_3	Tradução	short chain alcohol
miR156-4_3	Clivagem	trans-2-enoyl- reductase dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 3 of pyruvate dehydrogenase complex
miR158_1	Clivagem	pyruvate dehydrogenase complex
miR158_1	Tradução	dna repair protein rad50
miR158_1	Tradução	meiotic nuclear division protein 1-like protein
miR158_12	Clivagem	3-oxoacyl-
miR158_12	Clivagem	acyl-activating enzyme 7 dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 1 of pyruvate dehydrogenase complex
miR158_12	Clivagem	pyruvate dehydrogenase complex
miR158_12	Tradução	lipase family protein
miR158_12	Tradução	omega-3 fatty acid desaturase
miR158_12	Clivagem	rossmann-fold nad -binding domain-containing protein
miR158_12	Clivagem	zinc finger ran-binding domain-containing protein 3-like
miR158_16	Clivagem	3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase iii (kas iii) dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 1 of pyruvate dehydrogenase complex
miR158_16	Clivagem	pyruvate dehydrogenase complex
miR158_16	Tradução	dna repair protein rad50
miR158_16	Clivagem	lipase family protein
miR158_16	Clivagem	n-alpha-acetyltransferase auxiliary subunit-like
miR158_16	Tradução	omega-3 fatty acid desaturase

miR158_16	Clivagem	phd finger family protein
miR158_16	Clivagem	phd finger family protein
miR158_16	Clivagem	phd finger family protein
miR158_16	Tradução	ring u-box domain-containing protein
miR158_16	Clivagem	rossmann-fold nad -binding domain-containing protein
miR158_16	Tradução	zinc finger ran-binding domain-containing protein 3-like dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 1 of pyruvate dehydrogenase complex
miR158_2	Clivagem	pyruvate dehydrogenase complex
miR158_2	Tradução	lipase family protein
miR158_2	Tradução	omega-3 fatty acid desaturase
miR158_2	Tradução	protein
miR158_2	Clivagem	rossmann-fold nad -binding domain-containing protein
miR158_2	Clivagem	zinc finger ran-binding domain-containing protein 3-like
miR158_3	Clivagem	meiotic nuclear division protein 1-like protein
miR158_3	Tradução	phd finger family protein dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 3 of pyruvate dehydrogenase complex
miR158_4	Clivagem	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 3 of pyruvate dehydrogenase complex
miR158_4	Clivagem	pyruvate dehydrogenase complex
miR158_4	Tradução	dna repair protein rad50
miR158_4	Tradução	meiotic nuclear division protein 1-like protein
miR158_4	Clivagem	valyl-trna synthetase-like dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 1 of pyruvate dehydrogenase complex
miR158_9	Clivagem	pyruvate dehydrogenase complex
miR158_9	Tradução	lipase family protein
miR158_9	Tradução	omega-3 fatty acid desaturase
miR158_9	Tradução	protein
miR158_9	Clivagem	rossmann-fold nad -binding domain-containing protein
miR158_9	Clivagem	zinc finger ran-binding domain-containing protein 3-like
miR159_1	Clivagem	at1g48030-like protein
miR159_1	Clivagem	at1g74960 f9e10_19
miR159_1	Tradução	glycerol-3-phosphate acyltransferase
miR159_1	Clivagem	meiotic nuclear division protein 1-like protein
miR159_1	Clivagem	protein
miR159_1	Clivagem	protein
miR159_15	Tradução	ethylene-responsive transcription factor 5
miR159_15	Clivagem	hypoxia up-regulated protein 1-like
miR159_15	Clivagem	protein strawberry notch-like
miR159_2	Clivagem	dihydrolipoamide dehydrogenase
miR159_2	Tradução	glycerol-3-phosphate acyltransferase
miR159_2	Clivagem	meiotic nuclear division protein 1-like protein
miR159_2	Clivagem	protein
miR159_2	Clivagem	protein
miR159_6	Tradução	glycerol-3-phosphate acyltransferase
miR159_6	Clivagem	meiotic nuclear division protein 1-like protein
miR162_1	Tradução	26s proteasome aaa-atpase subunit rpt5a

miR162_1	Clivagem	bifunctional purine biosynthesis
miR162_1	Tradução	late embryogenesis abundant protein
miR162_1	Clivagem	tryptophan synthase beta-subunit
miR162_1	Clivagem	ubiquitin-protein ligase 1
miR164_51	Clivagem	aminoalcoholphosphotransferase
miR164_51	Clivagem	e3 ubiquitin-protein ligase orthrus 2
miR164_51	Clivagem	lipid phosphate phosphatase 3
miR166_1	Clivagem	heat shock protein binding protein
miR166_1	Clivagem	Imbr1-like membrane protein
miR166_1	Tradução	protein
miR166_3	Tradução	heat shock protein binding protein
miR166_70	Tradução	ruvb-like 1-like
miR167_78	Tradução	malonyl- :acyl carrier protein transacylase
miR167_78	Clivagem	patatin-like phospholipase domain-containing protein
miR167_78	Tradução	protein
miR167_78	Tradução	sugar-dependent 1-like protein
miR167_78	Tradução	transcription factor bhlh140-like
miR167-1_1	Tradução	ctp:phosphocholine cytidyltransferase
miR167-1_1	Tradução	malonyl- :acyl carrier protein transacylase
miR167-1_1	Tradução	maoc-like dehydratase domain-containing protein
miR167-1_1	Clivagem	patatin-like phospholipase domain-containing protein
miR167-1_1	Tradução	sugar-dependent 1-like protein
miR167-1_2	Tradução	acyl-coenzyme a thioesterase 8-like
miR167-1_2	Clivagem	dna binding
miR167-1_2	Tradução	protein pdi-like 5-4
miR167-1_2	Tradução	protein reticulata-related 1
miR167-1_2	Clivagem	xh xs domain-containing protein
miR167-2_6	Tradução	malonyl- :acyl carrier protein transacylase
miR167-2_6	Clivagem	patatin-like phospholipase domain-containing protein
miR167-2_6	Clivagem	tata box binding protein associated factor-like protein
miR168_1	Tradução	(+)-neomenthol dehydrogenase
miR168_1	Clivagem	heat shock 70 kda mitochondrial-like
miR168_2	Clivagem	heat shock 70 kda mitochondrial-like
miR168_2	Tradução	phd finger family protein
miR168_3	Clivagem	heat shock 70 kda mitochondrial-like
miR168_3	Tradução	phd finger family protein
miR168_4	Clivagem	dead-box atp-dependent rna helicase 24
miR168_4	Clivagem	dienelactone hydrolase family protein
miR168_4	Clivagem	heat shock 70 kda mitochondrial-like
miR168_4	Clivagem	phd finger family protein
miR168_4	Clivagem	triacylglycerol lipase sdp1-like
miR169_104	Clivagem	2-alkenal reductase
miR169_104	Clivagem	acyl-acyl thioesterase
miR169_104	Clivagem	trna (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyltransferase

miR169_95	Tradução	dna mismatch repair protein msh6-1
miR169_95	Clivagem	dna repair and recombination protein rad54-like protein
miR169-1_1	Clivagem	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
miR169-1_1	Tradução	beta-ketoacyl-acyl synthase 2
miR169-1_1	Clivagem	dna repair and recombination protein rad54-like protein
miR169-1_2	Tradução	membrane bound o-acyl transferase family protein
miR170_109	Clivagem	frigida
miR170_109	Clivagem	lipase class 3 family protein
miR170_109	Clivagem	opc-8:0 ligase1
miR170_109	Clivagem	pti1-like tyrosine-protein kinase at3g15890-like
miR171_112	Tradução	acyl:coa ligase acetate-coa synthetase-like protein
miR171_112	Tradução	long chain acyl- synthetase 1
miR171_112	Clivagem	protein
miR171_112	Clivagem	protein
miR172_1	Clivagem	at2g46020-like protein
miR172_1	Tradução	lipin-like protein
miR172_1	Clivagem	peroxisomal -dienoyl- reductase phosphatidylinositol n-acetylglucosaminyltransferase subunit p-like protein
miR172_1	Clivagem	snf2 and helicase domain-containing protein
miR172_1	Tradução	snf2 and helicase domain-containing protein alcohol dehydrogenase transcription factor myb sant-like protein
miR172_121	Clivagem	protein
miR172_121	Clivagem	floral homeotic protein apetala 2
miR172_121	Clivagem	floral homeotic protein apetala 2
miR172_121	Clivagem	protein
miR172_126	Clivagem	carbohydrate-binding x8 domain-containing protein glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein mfp-a
miR172_126	Tradução	mfp-a
miR172_126	Tradução	gtp-binding family protein
miR172_126	Clivagem	pyruvate dehydrogenase e1 alpha subunit
miR172_126	Tradução	short chain alcohol
miR172_126	Tradução	snf2 and helicase domain-containing protein
miR172_2	Clivagem	floral homeotic protein apetala 2
miR172_2	Clivagem	floral homeotic protein apetala 2
miR172_2	Clivagem	protein
miR1885_210	Tradução	amidohydrolase family protein
miR1885_210	Tradução	esterase lipase thioesterase family protein
miR1885_210	Tradução	long-chain acyl- synthetase 7
miR1885_210	Tradução	opc-8:0 ligase1
miR319_130	Clivagem	fatty acid elongase 3-ketoacyl- synthase 1 glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein mfp-a
miR319_130	Clivagem	mfp-a
miR319_130	Tradução	h(+)-atpase 2
miR319_130	Tradução	protein
miR319_131	Tradução	long chain acyl- synthetase 8-like

miR319_132	Clivagem	pyruvate dehydrogenase e1 alpha subunit
miR319_132	Clivagem	rna recognition motif-containing protein
miR319_132	Clivagem	rna recognition motif-containing protein
miR319_133	Clivagem	fatty acid elongase 3-ketoacyl- synthase 1 glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein
miR319_133	Clivagem	mfp-a
miR319_133	Tradução	h(+)-atpase 2
miR319_133	Tradução	protein
miR319_135	Clivagem	fatty acid elongase 3-ketoacyl- synthase 1
miR319_135	Clivagem	protein
miR319_135	Clivagem	protein
miR319_135	Clivagem	rna recognition motif-containing protein
miR319_135	Clivagem	rna recognition motif-containing protein
miR319_135	Tradução	rossmann-fold nad -binding domain-containing protein
miR390_144	Clivagem	acyl- synthetase
miR390_144	Clivagem	atp binding
miR390_144	Clivagem	lrr receptor-like serine threonine-protein kinase erl1
miR390_144	Tradução	lrr receptor-like serine threonine-protein kinase fei 1-like
miR390_144	Clivagem	phd finger family protein probable lrr receptor-like serine threonine-protein kinase
miR390_144	Clivagem	at1g67720-like
miR390_144	Clivagem	protein
miR390_144	Clivagem	protein kinase domain-containing protein
miR390_144	Clivagem	protein kinase family protein
miR390_144	Clivagem	receptor protein kinase
miR390_144	Clivagem	white-brown-complex abc transporter family
miR393-1_1	Tradução	chd3-type chromatin-remodeling factor pickle-like
miR393-1_1	Tradução	cinnamyl-alcohol dehydrogenase
miR393-1_1	Tradução	def protein
miR393-1_1	Tradução	dna excision repair protein ercc-6-like
miR393-1_1	Tradução	dna excision repair protein ercc-6-like
miR393-1_1	Tradução	phospholipid glycerol acyltransferase family protein
miR393-1_1	Tradução	receptor-like protein kinase
miR393-1_1	Tradução	thymidine kinase
miR393-1_2	Clivagem	caleosin-related protein
miR393-1_2	Clivagem	caleosin-related protein
miR393-1_2	Clivagem	embryo-specific protein 1
miR393-1_2	Clivagem	embryo-specific protein 1
miR393-2_1	Tradução	esterase lipase thioesterase family protein
miR393-2_1	Clivagem	heat shock transcription factor 1
miR393-2_1	Tradução	phospholipid glycerol acyltransferase family protein dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 2 of
miR393-3	Tradução	pyruvate dehydrogenase complex
miR393-3	Tradução	glutathione reductase
miR393-3	Tradução	phospholipid glycerol acyltransferase family protein
miR393-3	Clivagem	ubiquitin-protein ligase 1

miR394_2	Clivagem	acetyl-coenzyme a carboxylase carboxyl transferase subunit alpha
miR394_2	Tradução	at3g58730-like protein
miR394_2	Clivagem	chromatin remodeling 31
miR394_2	Clivagem	hypoxia up-regulated protein 1-like
miR394_2	Clivagem	myosin heavy chain-related protein
miR394_2	Clivagem	nucleoprotein tpr
miR396_1	Tradução	f-box protein at3g54460-like
miR396_1	Clivagem	glucose and ribitol dehydrogenase like-2
miR396_1	Clivagem	nedd8-activating enzyme e1 catalytic subunit
miR396_1	Clivagem	ribosomal protein l17-like protein
miR396_1	Clivagem	tata box binding protein associated factor-like protein
miR396_164	Tradução	2-oxoglutarate dehydrogenase e2 subunit
miR396_164	Clivagem	acyl-coenzyme a oxidase peroxisomal-like
miR396_164	Clivagem	atp-dependent helicase rhp16-like
miR396_164	Clivagem	auxin efflux carrier component 7
miR396_164	Tradução	binding protein
miR396_164	Tradução	chd3-type chromatin-remodeling factor pickle-like
miR396_164	Clivagem	chloroplast carboxyltransferase alpha subunit isoform 2
miR396_164	Clivagem	dimethyladenosine transferase glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein
miR396_164	Clivagem	mfp-a
miR396_164	Tradução	protein
miR396_164	Clivagem	senescence-associated protein 13
miR396_164	Tradução	swi2 snf2-like protein
miR396_164	Clivagem	transcription factor
miR396_165	Tradução	chd3-type chromatin-remodeling factor pickle-like
miR396_165	Clivagem	dimethyladenosine transferase
miR396_165	Clivagem	multidrug resistance protein abc transporter family
miR396_165	Tradução	protein
miR396_165	Clivagem	senescence-associated protein 13
miR396_165	Tradução	swi2 snf2-like protein
miR396_165	Clivagem	transcription factor
miR396_166	Tradução	chd3-type chromatin-remodeling factor pickle-like
miR396_166	Clivagem	dimethyladenosine transferase
miR396_166	Clivagem	multidrug resistance protein abc transporter family
miR396_166	Tradução	protein
miR396_166	Clivagem	senescence-associated protein 13
miR396_166	Tradução	swi2 snf2-like protein
miR396_166	Clivagem	transcription factor
miR396_170	Clivagem	ethylene responsive element binding factor 2
miR396_170	Clivagem	tata box binding protein associated factor-like protein
miR396_171	Tradução	f-box protein at3g54460-like
miR396_171	Clivagem	glucose and ribitol dehydrogenase like-2
miR396_171	Clivagem	nedd8-activating enzyme e1 catalytic subunit

miR396_171	Clivagem	ribosomal protein l17-like protein
miR396_171	Clivagem	tata box binding protein associated factor-like protein
miR396_172	Clivagem	ethylene responsive element binding factor 2
miR396_172	Clivagem	phosphatidic acid phosphatase
miR396_172	Tradução	protein
miR396_172	Clivagem	tata box binding protein associated factor-like protein
miR396_2	Tradução	f-box protein at3g54460-like
miR396_2	Clivagem	tata box binding protein associated factor-like protein
miR396_3	Clivagem	nedd8-activating enzyme e1 catalytic subunit
miR396_3	Clivagem	phd finger family protein
miR396_3	Clivagem	short chain alcohol dehydrogenase
miR396_3	Tradução	tata box binding protein associated factor-like protein
miR398_176	Clivagem	cdk5rap3-like protein
miR398_176	Clivagem	nucleoprotein tpr
miR399_180	Clivagem	glycerol-3-phosphate acyltransferase 6
miR399_180	Tradução	protein
miR400_185	Tradução	acyl- oxidase
miR400_185	Tradução	ap2 domain-containing transcription factor
miR400_185	Clivagem	glycerol-3-phosphate acyltransferase hypothetical protein ARALYDRAFT_909308 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]
miR400_185	Clivagem	lyrata subsp. lyrata]
miR400_185	Tradução	microfibril-associated protein
miR400_185	Clivagem	pentatricopeptide repeat-containing protein
miR400_185	Clivagem	prenylated rab acceptor family protein
miR400_185	Clivagem	protein strawberry notch-like
miR400-1_1	Clivagem	glycerol-3-phosphate acyltransferase hypothetical protein ARALYDRAFT_909308 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]
miR400-1_1	Clivagem	lyrata subsp. lyrata]
miR400-1_1	Tradução	microfibril-associated protein
miR400-1_1	Clivagem	pentatricopeptide repeat-containing protein
miR400-1_1	Clivagem	prenylated rab acceptor family protein
miR400-1_1	Clivagem	protein strawberry notch-like
miR403_187	Clivagem	carnitine racemase like protein
miR403_187	Clivagem	chd3-type chromatin-remodeling factor pickle-like
miR403_187	Tradução	chloroplast biotin carboxylase
miR403_187	Tradução	long-chain acyl- synthetase
miR403_187	Clivagem	lysophosphatidic acid acyltransferase
miR403_187	Tradução	pentatricopeptide repeat-containing protein
miR408_1	Clivagem	acyl- -binding protein
miR408_1	Clivagem	tropine dehydrogenase
miR824_1	Clivagem	diacylglycerol acyltransferase glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein mfp-a
miR824_1	Clivagem	mfp-a
miR824_1	Tradução	lysocardiolipin and lysophospholipid acyltransferase
miR824_1	Tradução	protein
miR824_1	Tradução	protein

miR824_1	Clivagem	threonine synthase
miR824_2	Clivagem	4-coumarate-- ligase family protein
miR824_2	Clivagem	amp-binding protein
miR824_2	Clivagem	dihydrolipoamide dehydrogenase
miR824_2	Tradução	exocyst complex component 7
miR824_2	Clivagem	long chain acyl- synthetase 1
miR824_2	Clivagem	patatin-like phospholipase domain-containing protein p-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase-like protein
miR824_2	Tradução	protein
miR824_2	Clivagem	triacylglycerol lipase sdp1
miR824_3	Tradução	lysocardiolipin and lysophospholipid acyltransferase glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein
miR824_4	Clivagem	mfp-a
miR824_4	Tradução	lysocardiolipin and lysophospholipid acyltransferase
miR824_4	Tradução	protein
miR824_4	Tradução	protein
miR824_4	Clivagem	threonine synthase
miR827_1	Clivagem	floral homeotic protein apetala 2
miR827_1	Tradução	lipase family protein
miR827_1	Clivagem	ring-h2 finger protein rhy1a

Diversas abordagens de predição de genes-alvo foram utilizadas com sucesso para a identificação de alvos de miRNA em plantas (Zhang, 2005; Alves et al., 2009). Na espécie *B. napus*, Xie e colaboradores identificaram 67 potenciais genes-alvo para 21 miRNAs através de predição computacional (Xie et al., 2007). Um amplo número de genes-alvo foi identificado em diferentes espécies de plantas como, por exemplo, *A. thaliana*, soja e arroz. Recentemente, foram realizados estudos em *B. napus* para a comprovação de genes-alvo, utilizando a técnica de sequenciamento de degradoma. Xu e colaboradores identificaram 33 genes-alvo não redundantes de 17 miRNAs conservados em *B. napus* e 19 genes-alvos não redundantes de miRNAs específicos da espécie *B. napus* utilizando a técnica de sequenciamento de degradação de mRNA (Xu et al., 2012). Zhou e colaboradores, identificaram em *B. napus* 802 alvos para 37 famílias de miRNA por sequenciamento de bibliotecas degradoma, a partir de amostras de raízes e parte aérea tratadas com Cádmio e amostras controle (sem tratamento) (Zhao Sheng Zhou, Jian Bo Song 2, 2012). Comparando os nossos possíveis alvos com estes dois trabalhos, Xu et al., 2012 e Zhou et al., 2012, encontramos sobreposição significativa entre eles com base nas anotações de genes-alvo incluindo; NF-Y

subunidades, alvo da família do miR169 e fatores de transcrição AP2-like, alvo da família do miR172.

Neste trabalho, foi priorizada a busca de genes-alvo envolvidos no metabolismo lipídico e diversas proteínas importantes neste processo como, diacilglicerol aciltransferase, ácido graxo elongase e ácido graxo dessaturase, entre outras. Membros da família miR156 e suas isoformas apresentaram potenciais genes-alvo dentro da família de transportadores ABC. Interessantemente, a família miR156 também apresentou diversos genes-alvo pertencentes a família de enzimas envolvidas na degradação de ácidos graxos, monoacilglicerol lípase e esterase lípase. Um dos alvos preditos para o miR158_12 corresponde a uma enzima fundamental na rota de formação de ácido graxos insaturados, a ácido graxo dessaturase-3. Estes possíveis alvos, necessitam de comprovação experimental. Além disso, potenciais genes-alvo de diversos miRNAs não apresentaram função anotada nos bancos de dados.

3.2 Análise do padrão de expressão de microRNAs por RT-qPCR em amostras de sementes de *B. napus*

Para analisar o padrão de expressão dos miRNAs identificados por Körbes et al., 2012, ao longo do desenvolvimento de sementes, um subconjunto de 40 miRNAs (miR824-1, miR03-1, miR156-1_1, miR156-3_3, miR06-1, miR159-1, miR156-3_3, miR07-2_1, miR04-1, miR156-1_11, miR403-187, miR169-104, miR08-1, miR393-1_1, miR396-172, miR168-1, miR824-2, miR156-4, miR02-2, miR169-95, miR167-2_6, miR156-2_2, miR05-1, miR156-1_10, miR158-12, miR158-16, miR164-51, miR393-1_2, miR1140_1, miR167-1_11, miR167-1_2, miR172-1, miR319-130, miR319-132, miR390-144, miR400-185, miR09-1, miR396-144, miR01-1, miR07-1) foram testados por RT-qPCR (Tabela 2).

Tabela 2- Sequencias de primers e características dos fragmentos de 40 miRNAs testados por RT-qPCR.

miRNAs	Primers (F/R) <i>B. napus</i> (5'-3')	Tamanho do amplicon (bp)	T _m (°C)	Eficiência de amplificação (%)	R ²
miR393-1_1	ATCATGCGATCTCATTGGATT GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.34	1.96	0.993
miR167-2_6	TGAAGCTGCCAGCATGATCTAT GTGCAGGGTCCGAGGT	72	81.46	1.74	0.964
miR156-1_10	GCTCACTGCTCTATCTGTCAGG GTGCAGGGTCCGAGGT	72	80.45	1.93	0.982
miR02_2	AGCCTGGCTCTGATACCATGAAGT GTGCAGGGTCCGAGGT	74	81.56	1.85	0.995
miR169_104	GGCAAGTTGTCCTTCGGCTACA GTGCAGGGTCCGAGGT	72	80.35	1.89	0.994
miR06_1	TCGTCTGATACTAATGGGTCA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.67	1.9	0.994
miR07-2_1	AGTTCAGATGCTGTGAGCGGC GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.56	1.92	0.995
miR403_187	TTAGATTCACGCACAACTCG GTGCAGGGTCCGAGGT	71	80.78	1.96	0.998
miR05_1	TAAGTATCCCTATAGTTCTGA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.45	1.86	0.993
miR08_1	TGTGGCTTTAACATCTTAACTA GTGCAGGGTCCGAGGT	72	80.95	1,83	0.988
miR07-1_1	CGCTCACAGCATCTGAACTCT GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.26	1.9	0.982
miR168_4	TTCGCTTGGTGCAGGTCCGGGA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.67	1.96	0.997

miR04_1	TTTTGCGTTTCAACTCGGTCC GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.78	1.94	0.994
miR156-3_4	GCTCACTGCTCTTTCTGTCCAG GTGCAGGGTCCGAGGT	71	80.96	1.92	0.992
miR156-1_11	TGCTCACTGCTCTATCTGTCCAG GTGCAGGGTCCGAGGT	72	81.67	1.83	0.984
miR1140_1	ACAGCCTAAACCAATCGGAG GTGCAGGGTCCGAGGT	70	80.67	1.89	0.991
miR03_1	TCCACCCATACCATACAGACCC GTGCAGGGTCCGAGGT	72	81.49	1.91	0.998
miR156-1_1	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC GTGCAGGGTCCGAGGT	70	80.56	1.95	0.989
miR396-172	TTCAATAAAGCTGTGGGAAG GTGCAGGGTCCGAGGT	70	80.78	1.93	0.986
miR824-2	CCTTCTCATCGATGGTCTAGA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.72	1.82	0.997
miR156-2_2	GCTCACTGCTTTATCTGTCAGA GTGCAGGGTCCGAGGT	72	81.05	1.95	0.994
miR156-4_1	TTGACAGAAGAAAGAGAGCAC GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.83	1.83	0.994
miR158-12	CTTTGTCTATCGTTTGGAAAA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.38	1.86	0.983
miR158-16	TTTGTCTATCGTTTGGAAAAG GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.11	1.69	0.958
miR164-51	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	80.9	1.74	0.931

miR393-1_2	TCCAAAGGGATCGCATTGATCC GTGCAGGGTCCGAGGT	72	81.34	1.78	0.948
miR167-1_1	TGAAGCTGCCAGCATGATCTA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	80.75	1.88	0.988
miR172_1	GCATCATCTTCAAGATTCAGA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.75	1.72	0.959
miR319_130	TTGGACTGAAGGGAGCTCCTT GTGCAGGGTCCGAGGT	71	80.23	1.63	0.945
miR319-132	TTTGGACTGAAGGGAGCTCCT GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.73	1.95	0.989
miR390_144	AAGCTCAGGAGGGATAGCGCC GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.72	1.93	0.986
miR09-1	TAATGGTGATTTTGAATCTAA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.73	1.67	0.953
miR396-164	TTCCACAGCTTTCTTGAAGCTT GTGCAGGGTCCGAGGT	71	80.83	1.72	0.957
miR01-1_1	ATAAATCCCAAGCATCATCCA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.49	1.85	0.991
miR400-185	TATGAGAGTATTATAAGTCAC GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.61	1.75	0.943
miR156-3_3	TGCTCACTGCTCTTTCTGTCAGA GTGCAGGGTCCGAGGT	73	81.55	1.96	0.982
miR159_1	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.13	1.92	0.995
miR167-1_2	TGAAGCTGCCAGCATGATCTA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.56	1.88	0.984

miR168_1	TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	80.78	1.82	0.982
miR824-1	TAGACCATTTGTGAGAAGGGA GTGCAGGGTCCGAGGT	71	81.47	1.89	0.994

Dos 40 miRNAs testados, nove miRNAs, miR167-2_6, miR158-16, miR164_51, miR393-1_2, miR172-1, miR319-132, miR400-185, miR09-1, miR396-164, apresentaram ampliações e temperaturas de fusão comparáveis às dos controles negativos e as sequências de seus oligonucleotídeos propiciaram a formação de dímeros e amplificação inespecífica. A expressão dos miRNAs por RT-qPCR pode ser agrupada em 3 grupos: Grupo 1 (G1) -miRNAs que apresentaram forte expressão nos estágios iniciais do desenvolvimento (14 e 21 DAF); Grupo 2 (G2)- miRNAs com maior expressão nos intermediários do desenvolvimento (35 e 42, DAF); Grupo 3 (G3)- miRNAs que não foram diferencialmente expressos ao longo do desenvolvimento.

A maioria dos miRNAs, grupo G2 (Figura 3 e 4), foram mais expressos durante os estágios tardios do desenvolvimento, enquanto uma minoria dos miRNAs (grupo G1) (Figura 2), foram preferencialmente expressos nos estágios iniciais do desenvolvimento. Os miRNAs do grupo G1 (miR156-1_11, miR396-172, miR824-2) tiveram uma expressão transiente no estágio de 7 a 14 DAF (Figura 2 A B C). Houve um forte aumento da expressão em 21 DAF. Após o estágio de 21 DAF, a expressão foi significativamente reduzida até o final do desenvolvimento (63 DAF). O miR03-1, demonstrou uma tendência de aumento de expressão nos estágios iniciais chegando na sua expressão máxima em 21 DAF. Após este estágio a expressão do miR03-1 também foi reduzida até o final do desenvolvimento embrionário (Figura 2D). O padrão de expressão do grupo G1, sugere que possivelmente os miRNAs (miR156-1_11, miR396-172, miR824-2 e miR03-1) atuem na regulação negativa de genes indutores da maturação.

Os miRNAs do grupo G2, apresentaram uma forte expressão nos estágios intermediários do desenvolvimento. A maioria dos miRNAs do grupo G2, como miRNA824-1, miR168-4, miR156-1_1, miR04-1, miR158-12, miR1140_1, miR167-1_1, miR167-1_2 e miR07-1, miR159-1, miR168-1, miR169-95, tiveram sua expressão induzida em 35 DAF (Figura 3). Os miRNAs miR06-1, miR07-2_1, miR403-187, miR169-104, miR393-1_1, miR02-2, miR156-1_10 apresentaram uma tendência a picos de expressão em 28DAF e 42DAF (Figura 4). O miR156-4 teve sua expressão induzida somente em 42 DAF (Figura 4.H). Os miRNAs do grupo 2 possivelmente estão envolvidos com processos tardios do programa de maturação como tolerância a dessecação ou ainda inibindo genes importantes para o processo germinativo. Este hipótese estaria de acordo com a proposta de Nodine e Bartel, de que, em plantas, os

miRNAs regulam as transições no desenvolvimento pela repressão de mRNAs que devem agir posteriormente (Nodine and Bartel, 2010). Nos embriões de *A. thaliana* no estágio de oito células, por exemplo, foi verificado que miRNAs reprimem genes que devem ser expressos nas células filhas, em um momento posterior do desenvolvimento do embrião (Nodine and Bartel, 2010). Portanto, em vez de atenuar funções pré-existentes, como ocorre em animais, os miRNAs previnem a ação precoce de genes em plantas (Nodine and Bartel, 2010). miRNAs do grupo G3, miR156-3_3, miR156-3_4, miR08-1, miR156-2_2, miR05-1, miR319-130, miR390-144, miR01-1, não foram diferencialmente expressos durante o desenvolvimento de sementes (Figura 5).

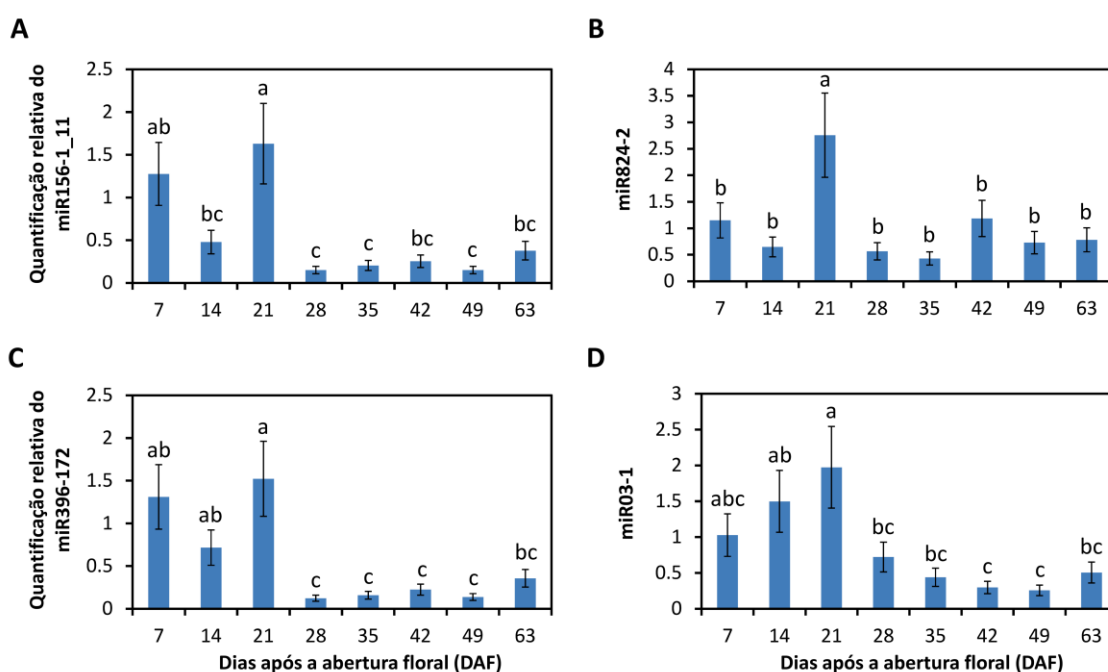


Figura 2- Expressão relativa de miRNAs do grupo 1 (G1) em diferentes estágios do desenvolvimento de sementes após a abertura floral. Dados de expressão relativa foram normalizados utilizando 3 normalizadores, miR156-7, miR11-1, miR408-1. Barras representam a média de quadruplicatas biológicas e técnicas e traços representam o desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatísticas conforme o teste ANOVA seguida por teste tukey: (A)-miR156-1_11; (B)-miR824-2; (C)-miR396-172; (D)-miR03-1.

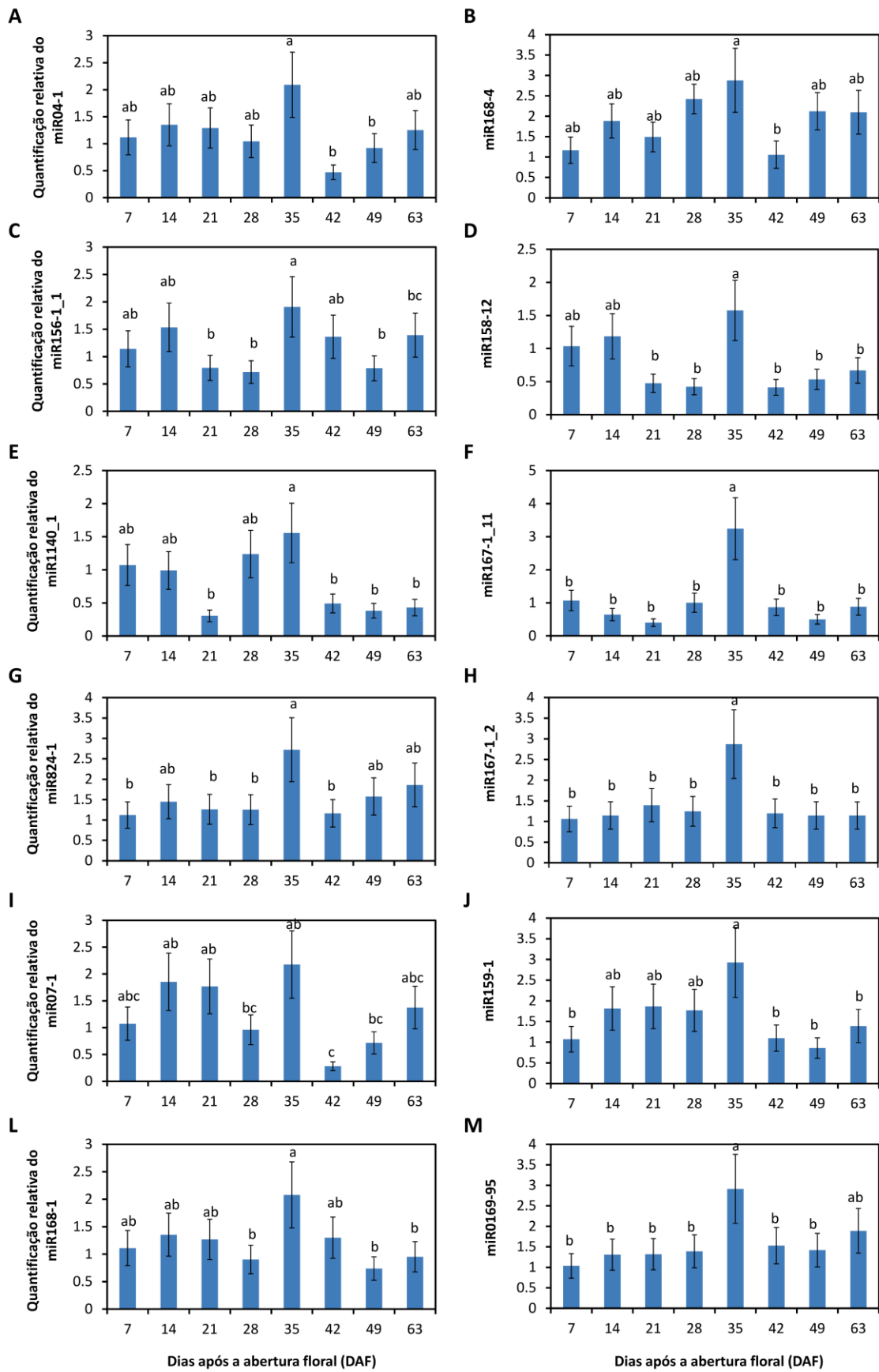


Figura 3 Expressão relativa de miRNAs do grupo 2 (G2) em diferentes estágios do desenvolvimento de sementes após a abertura floral. Dados de expressão relativa foram normalizados utilizando 3 normalizadores, miR156-7, miR11-1, miR408-1. Barras representam a média de quadruplicatas biológicas e técnicas e traços representam o desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatísticas conforme o teste ANOVA seguida por teste tukey: (A)-miR04-1; (B)-miR168-4; (C)-miR156-1_1; (D)-miR158-12; (E)- miR1140-1; (F)-miR167-1_11; (G)-miR824-1; (H)-miR167-1_2; (I)-miR07-1; (J)-miR159-1; (L)-miR168-1; (M)-miR169-95.

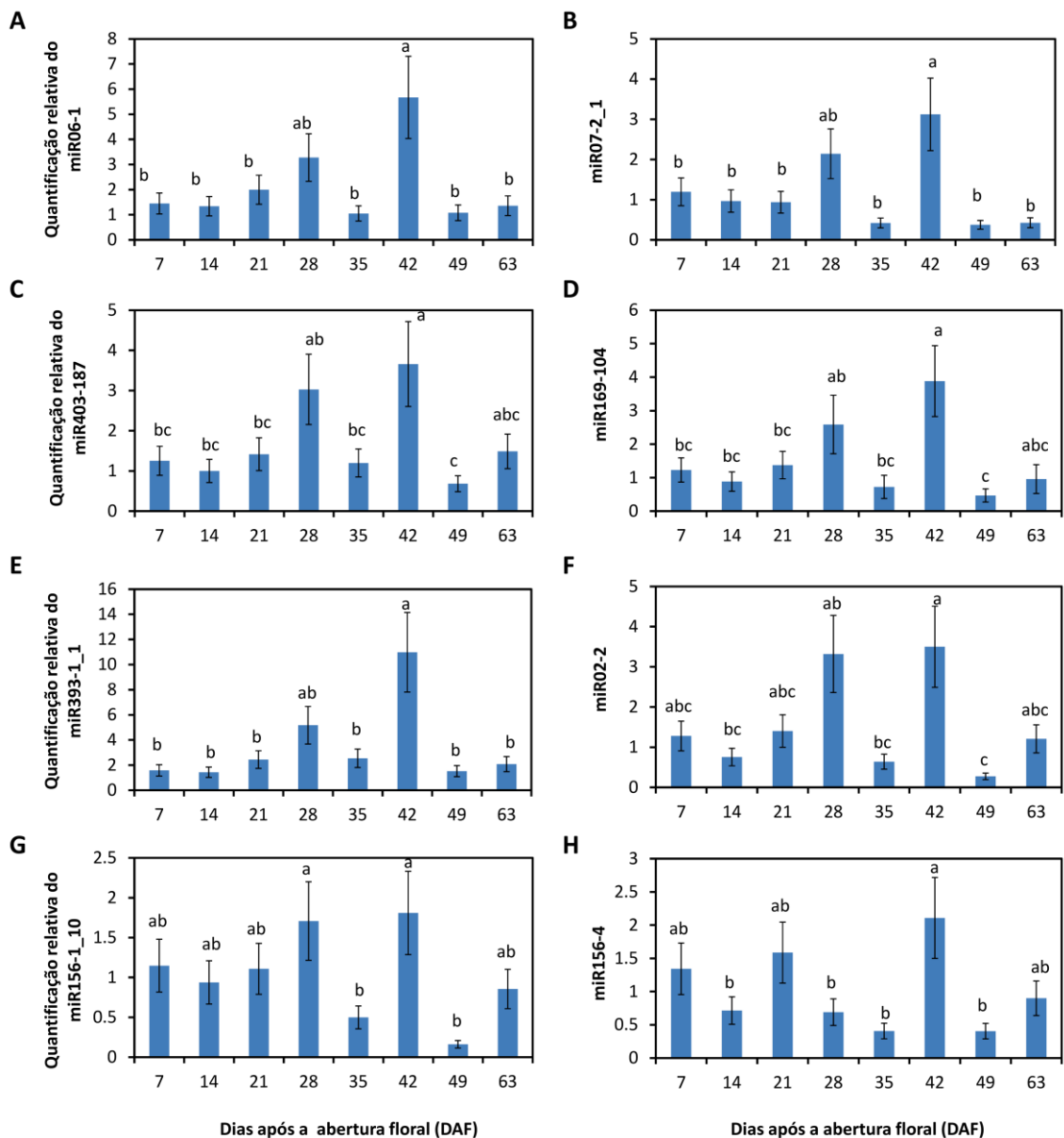


Figura 4- Expressão relativa de miRNAs do grupo 2 (G2) em diferentes estágios do desenvolvimento de sementes após a abertura floral. Dados de expressão relativa foram normalizados utilizando 3 normalizadores, miR156-7, miR11-1, miR408-1. Barras representam a média de quadruplicatas biológicas e técnicas e traços representam o desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatísticas conforme o teste ANOVA seguida por teste tukey: (A)-miR06-1; (B)-miR07-2_1; (C)-miR403-187; (D)-miR169-104; (E)-miR02-2; (F)-miR02-2; (G)-miR156-1_10; (H)-miR156-4.

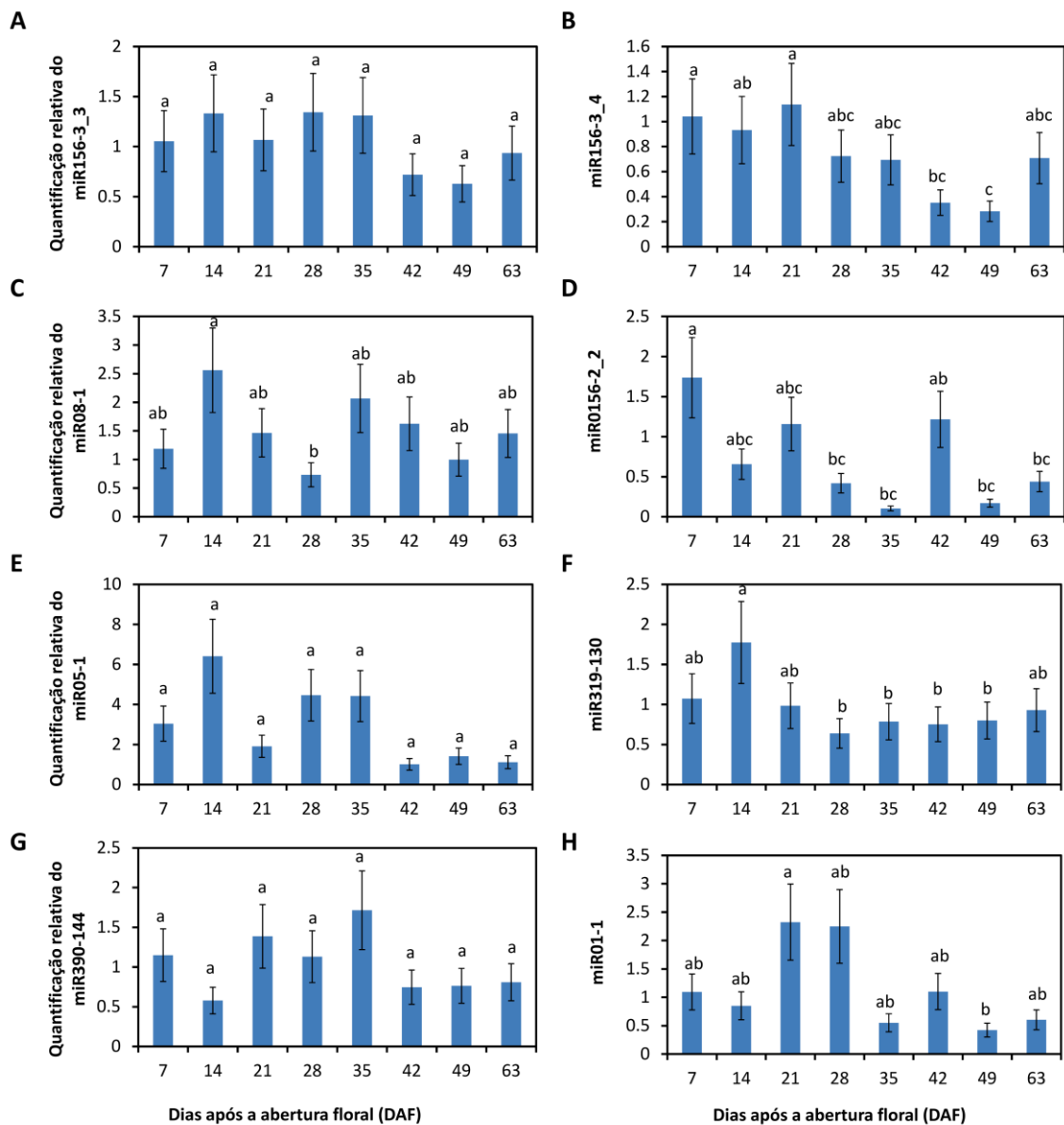


Figura 5- Expressão relativa de miRNAs do Grupo 3 (G3) em diferentes estágios do desenvolvimento de sementes após a abertura floral. Dados de expressão relativa foram normalizados utilizando 3 normalizadores, miR156-7, miR11-1, miR408-1. Barras representam a média de quadruplicatas biológicas e técnicas e traços representam o desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatísticas conforme o teste ANOVA seguida por teste tukey: miRNAs do Grupo (G3) não apresentaram diferença de expressão relativa durante o desenvolvimento de sementes. (A)-miR156-3_3; (B)-miR156-3_4; (C)-miR08-1; (D)-miR156-2_2; (E)-miR05-1; (F)-miR319-130; (G)-miR390-144; (H)-miR01-1.

3.2 Diferenças entre as análises de expressão por RNA-seq e RT-qPCR

Recentemente, Huang e colaboradores avaliaram o perfil de expressão de miRNAs durante a maturação de sementes de *B. napus* utilizando a técnica de sequenciamento de alto rendimento. Os miR159, miR158, miR166, miR400, miR403 apresentaram um aumento de expressão nos estágios finais do desenvolvimento. Entretanto, outro grupo de miRNAs: miR171, miR160 e miR394 apresentaram um aumento de expressão até 45 dias após o florescimento e então seus níveis de expressão foram reprimidos no estágio final de maturação, demonstrando que a expressão dos miRNAs durante o desenvolvimento de sementes segue um padrão temporal. Dentre todos os miRNAs avaliados neste trabalho, somente quatro miRNAs foram testados por RT-qPCR em nosso estudo. miR390-144, miR390-130, miR824-1 e miR156-1_1, apresentaram uma tendência no aumento de expressão nos estágios intermediários do desenvolvimento (30 até 45 DAF) nos dois trabalhos. Existem algumas discrepâncias em alguns estágios específicos entre estas duas análises. A existência de discrepâncias entre análises de expressão realizadas através de métodos diferentes são comuns e já foi relatada em outros estudos (Bloom et al., 2009). Além disso, as amostras não foram coletadas exatamente no mesmo estágio e no estudo de Huang e colaboradores não foram realizadas replicatas biológicas, impedindo análises estatísticas robustas e uma confiável análise de expressão

Como diversos miRNAs de uma mesma família possuem sequências maduras muito similares, mesmo usando oligonucleotídeos stem-loop, que conferem uma maior especificidade na amplificação nas reações de RT-qPCR, alguns membros e/ou isoformas dificilmente podem ser distinguidos (Chen et al., 2005), especialmente quando diferem apenas na extremidade 5'. Como membros de uma família podem se expressar diferentemente, a presença de um membro pode compensar a falta de outro em um tecido, resultando em níveis de expressão estáveis entre os tecidos. Isto pode explicar a ocorrência de um menor número de diferenças de expressão significativas em RT-qPCR que nas análises por RNA-seq, nas quais cada sequência foi analisada individualmente no trabalho de Huang e colaboradores e sequências com apenas um nucleotídeo de diferença foram distinguidas. Por um lado, ainda não se sabe até que ponto se deve analisar separadamente miRNAs que podem ser coexpressos e agir sobre

os mesmos sítios alvo devido à similaridade de suas sequências. E ainda que sejam realmente coexpressos, diferenças de apenas 1 nt podem de fato fazer miRNAs atuarem de maneiras diferentes (Ebhardt et al., 2010), o que irá refletir em seus níveis de expressão, tornando desaconselhável agrupá-los. No entanto, comparado a microarranjo e análise por dados de sequenciamento, a técnica de RT-qPCR foi considerada a mais confiável para medir a expressão diferencial de miRNAs (Git et al., 2010).

Conclusões

Os resultados desta dissertação demonstraram que miRNAs são expressos durante todo o desenvolvimento de sementes em *B. napus*. Alguns miRNAs foram altamente estáveis ao longo do processo de desenvolvimento de sementes, sendo assim, foram validados ótimos miRNAs genes de referencia para análise de expressão gênica por RT-qPCR. Um grande número de miRNAs, conservados e novos, apresentaram diferentes padrões de expressão quando avaliados por RT-qPCR. Múltiplos alvos relacionados ao metabolismo lipídico foram preditos para um grupo de miRNAs identificados por RNA-seq.

O desenvolvimento de sementes é regulado por uma rede complexa, constituída principalmente por interações entre fatores de transcrição, miRNAs e hormônios. Os padrões de expressão temporal dos miRNAs avaliados neste estudo sugere que os microRNAs agem fortemente na regulação gênica, atuando em diferentes estágios do desenvolvimento de sementes. De uma maneira geral, a grande diversidade de miRNAs, conservados e novos, identificados até o momento em sementes de *B. napus* proporciona novas perspectivas sobre as diversas redes regulatórias que ainda não foram completamente compreendidas.

Referencias

Alves L, Niemeier S, Hauenschild A, Rehmsmeier M, Merkle T (2009) Comprehensive prediction of novel microRNA targets in *Arabidopsis thaliana*. Nucleic acids research 37: 4010–4021

- Bloom JS, Khan Z, Kruglyak L, Singh M, Caudy A a (2009) Measuring differential gene expression by short read sequencing: quantitative comparison to 2-channel gene expression microarrays. *BMC genomics* 10: 221
- Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136: 642–655
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, et al (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem – loop RT – PCR. *Nucleic Acids Research* 33: 1–9
- Dai X, Zhao PX (2011) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic acids research* 39: 155–159
- Dai X, Zhuang Z, Zhao PX (2011) Computational analysis of miRNA targets in plants: current status and challenges. *Briefings in bioinformatics* 12: 115–121
- Ebhardt HA, Fedynak A, Fahlman RP (2010) Naturally occurring variations in sequence length creates microRNA isoforms that differ in argonaute effector complex specificity. *Silence* 1: 12
- Git A, Dvinge H, Osborne M, Kutter C, Hadfield J, Bertone P, Caldas C (2010) Systematic comparison of microarray profiling , real-time PCR , and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *Cancer Research* 16: 991–1006
- Huang D, Koh C, Feurtado JA, Tsang EW, Cutler AJ (2013) MicroRNAs and their putative targets in *Brassica napus* seed maturation. *BMC genomics* 14: 140
- Iliopoulos D, Drosatos K, Hiyama Y, Goldberg IJ, Zannis VI (2010) MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1alpha and affects lipid metabolism. *Journal of lipid research* 51: 1513–1523
- Körbes AP, Machado RD, Guzman F, Almerão MP, De Oliveira LFV, Loss-Morais G, Turchetto-Zolet AC, Cagliari A, Dos Santos Maraschin F, Margis-Pinheiro M, et al (2012) Identifying conserved and novel microRNAs in developing seeds of *Brassica napus* using deep sequencing. *PloS one* 7: e50663
- Li W-X, Oono Y, Zhu J, He X-J, Wu J-M, Iida K, Lu X-Y, Cui X, Jin H, Zhu J-K (2008) The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *The Plant cell* 20: 2238–2251
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods San Diego Calif* 25: 402–408

- Nodine MD, Bartel DP (2010) MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes & Development* 24: 2678–2692
- Song Q-X, Liu Y-F, Hu X-Y, Zhang W-K, Ma B, Chen S-Y, Zhang J-S (2011) Identification of miRNAs and their target genes in developing soybean seeds by deep sequencing. *BMC plant biology* 11: 5
- Troncoso-Ponce MA, Thrower NA, Ohlrogge and JB (2011) Comparative deep transcriptional profiling of four developing oilseeds. *The Plant Journal* 68: 1014–1027
- Voinnet O (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136: 669–687
- Willmann MR, Mehalick AJ, Packer RL, Jenik PD (2011) MicroRNAs Regulate the Timing of Embryo Maturation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 155: 1871–1884
- Xie FL, 1, , Kai Guo, An Ling Xiang, Yi Yong Zhu, Li Nie ZMY* (2007) Computational identification of novel microRNAs and targets.pdf. 1464–1474
- Xu MY, Dong Y, Zhang QX, Zhang L, Luo YZ, Sun J, Fan YL, Wang L (2012) Identification of miRNAs and their targets from *Brassica napus* by high-throughput sequencing and degradome analysis. *BMC genomics* 13: 421
- Zhang Y (2005) miRU: an automated plant miRNA target prediction server. *Nucleic acids research* 33: W701–4
- Zhao Sheng Zhou, Jian Bo Song 2, and ZMY 2 (2012) Genome-wide identification of *Brassica napus* microRNAs and their targets in response to cadmium. *Journal of experimental botany* 63: 4597 – 4613

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em plantas, os miRNAs atuam principalmente como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica através da clivagem do transcrito-alvo ou inibição da tradução (Voinnet, 2009). Espera-se que exista uma correlação inversa da expressão do miRNA e seu transcrito alvo devido ao papel de forte repressor do miRNA com seu alvo (Voinnet, 2009; Thiebaut et al., 2012; Wang, 2012). Entretanto, nem sempre isto é observado. Recentemente Alonso-Peral e colaboradores demonstraram que o nível de atuação do miRNA159 de *A. thaliana* não é a mesma quando comparada em diferentes tecidos. Em tecidos vegetativos, o miR159 reprime totalmente a expressão de dois transcritos: MYB33 e MYB65. Quando analisada a expressão do miR159 e seu alvo MYB33, em sementes de *A. thaliana* foi detectada uma co-expressão dos dois transcritos na camada de aleurona e em embriões de sementes em germinação. A análise do padrão de expressão em diferentes tempos da germinação de sementes de ecótipos de *A. thaliana* e um mutante *mir159* demonstrou que os níveis de transcritos do gene MYB33 foi semelhante entre os dois genótipos durante a germinação, mas muito maior no mutante *mir159* quando o processo germinativo foi finalizado. O autor sugere que em sementes em germinação, miR159 atua como regulador “fino” da expressão do seu transcrito alvo (Alonso-Peral et al., 2012).

Estes resultados vão ao encontro com relatos prévios que em alguns casos miRNAs atuam na regulação pós-transcricional da expressão gênica, “tamponando” a expressão do gene alvo através do estabelecimento de um limiar para a atuação do alvo dentro de uma complexa rede reguladora (Wu et al., 2009). A função de “tamponamento” dos miRNA pode ser fundamental para evitar a flutuação dos níveis de expressão de genes alvo e, por consequência, impedir os eventos de desenvolvimento aberrante.

Além disso, a regulação temporal e espacial é de fundamental importância para determinar a função tecido específica do miRNA. Para investigar a função do miR164 no controle da abundância do seu transcrito alvo CUC2, a expressão de CUC2 foi examinada em tecidos da inflorescência. Análises de Hibridização *in situ* demonstraram

que CUC2 tem sua expressão fortemente aumentada no carpelo em plantas mutantes *mir164*, quando comparada a plantas “wild-type”. Entretanto, os níveis de expressão de CUC2 nos estames não foi diferente quando comparado ao mutante *miR164* e “wild-type”. Estas diferenças tecido-específicas na acumulação de transcritos CUC2 corroboram com o padrão de expressão do miR164 em plantas “wild-type”, no qual é fortemente expresso no carpelo, mas não foi detectado no estame (Sieber et al., 2007). A análise da expressão do miR164 e CUC2 tecido específica não resultaria na correlação negativa se fosse analisado amostras destes tecidos juntamente, isto poderia resultar em uma correlação positiva, perdendo resultados mais precisos. Portanto, experimentos para o estabelecimento da regulação negativa dos miRNAs com seu transcrito alvo baseados no perfil de expressão precisam ser muito bem desenhados para se obter os reais resultados.

Diante destes resultados, conclui-se que é fundamental comprovar que o transcrito é realmente alvo do miRNA. Esta verificação deve ser realizada através de técnicas de PCR 5'RACE e análise de degradoma. Após esta comprovação é importante verificar a expressão temporal e espacial do miRNA e do seu gene alvo pela técnica de hibridização *in situ* e RT-qPCR e assim correlacionar o padrão de expressão existente entre a interação “miR/target”. É importante salientar que os miRNAs representam mais uma forma de regulação da expressão gênica, e ainda pouco se sabe sobre a regulação da expressão dos genes MIR (Lopez-Gomollon et al., 2012).

Em trabalho publicado recentemente por Körbes et al., 2012 foram identificados miRNAs, novos e conservados, diferencialmente expressos entre duas bibliotecas de pequenos RNAs (estágios iniciais do desenvolvimento e estágio de semente madura). Entretanto, o padrão de expressão nos diferentes estágios do desenvolvimento de sementes não foi analisado nesse estudo. Esta dissertação teve como principal objetivo avaliar o padrão de expressão dos miRNAs previamente identificados por Körbes e colaboradores, em diferentes estágios do desenvolvimento de sementes de *B. napus*. por RT-qPCR.

4. Referências Bibliográficas da Introdução e Considerações Finais

Alonso-Peral MM, Sun C, Millar A a. (2012) MicroRNA159 Can Act as a Switch or Tuning MicroRNA Independently of Its Abundance in *Arabidopsis*. PLoS ONE 7: e34751

Aukerman MJ, Sakai H (2003) Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2 -Like Target Genes The Plant Cell. 15: 2730–2741

Bailly C, Audigier C, Ladonne F, He M, Wagner Á, Pierre Â, Curie M (2001) Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. Journal of experimental botany 52:

Barbara Mazur, Enno Krebbers ST (1999) Gene Discovery and Product Development for Grain Quality Traits. Science 285: 372–375

Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 136: 215–233

Baud S, Boutin J, Miquel M, Lepiniec L, Rochat C (2002) An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. Plant Physiology and Biochemistry 40: 151–160

Baud S, Lepiniec L c (2009) Regulation of de novo fatty acid synthesis in maturing oilseeds of *Arabidopsis*. Plant Physiology and Biochemistry 47: 448–455

Sebastien Baud, Monica Santos Mendoza, Alexandra To, Erwana Harscoet, Loïc Lepiniec BD (2007) WRINKLED1 specifies the regulatory action of LEAFY COTYLEDON2 towards fatty acid metabolism during seed maturation in *Arabidopsis*. The Plant Journal 50: 825–838

Bewley J (1997) Seed Germination and Dormancy. The Plant Cell 9: 1055–1066

Bonington S (1975) Compositional Changes in Developing Rape Seed (*Brassica napus* L .). Planta 174: 163–174

Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. Science (New York, NY) 320: 1185–1190

Bustin S A, Benes V, Garson J a, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, et al (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry 55: 611–622

- Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 29: 23–29
- Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136: 642–655
- CODEX (1999) . Codex Standard for Named Vegetable Oils. CODEX-STAN 210: 1-16.
- Chen X (2009a) Small RNAs and their roles in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25: 21–44
- Chen X (2009b) Small RNAs and their roles in plant development. *Annual review of cell and developmental biology* 25: 21–44
- Choi JK, Holtzer S, Chacko S a, Lin ZX, Hoffman RK, Holtzer H (1991) Phorbol esters selectively and reversibly inhibit a subset of myofibrillar genes responsible for the ongoing differentiation program of chick skeletal myotubes. *Molecular and cellular biology* 11: 4473–4482
- Cui X, Xu SM, Mu DS, Yang ZM (2009) Genomic analysis of rice microRNA promoters and clusters. *Gene* 431: 61–66
- Curaba J, Spriggs A, Taylor JM, Li Z, Helliwell C a (2012) miRNA regulation in the early development of barley seed. *BMC Plant Biology* 12: 120
- Davoren PA, Mcneill RE, Lowery AJ, Kerin MJ, Miller N (2008) Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. *11: 1–11*
- Dean G, Cao Y, Xiang D, Provart NJ, Ramsay L, Ahad A, White R, Selvaraj G, Datla R, Haughn G (2011) Analysis of gene expression patterns during seed coat development in *Arabidopsis*. *Molecular plant* 4: 1074–1091
- Denis J. Murphy IC (1989) Biosynthesis of Seed Storage Products during Embryogenesis in Rapeseed, *Brassica napus*. *Journal of Plant Physiology* 135: 63–69
- Donson J, , , Yiwen Fang, Gregg Espiritu-Santo, Weimei Xing, Andres Salazar S, Miyamoto VA and WV (2002) Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Molecular Biology* 48: 75–97
- Feng H, Huang X, Zhang Q, Wei G, Wang X, Kang Z (2012) Selection of suitable inner reference genes for relative quantification expression of microRNA in wheat. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale* 51: 116–122

- Focks N, Benning C (1998) wrinkled1 : A Novel , Low-Seed-Oil Mutant of Arabidopsis with a Deficiency in the Seed-Specific Regulation of Carbohydrate Metabolism 1. 91–101
- Gachon C, Mingam A, Charrier B (2004) Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany* 55: 1445–1454
- Gazzarrini S, Tsuchiya Y, Lumba S, Okamoto M, McCourt P (2004) The transcription factor FUSCA3 controls developmental timing in Arabidopsis through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Developmental cell* 7: 373–385
- Giraudat J, Hauge BM, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman HM (1992) Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *The Plant cell* 4: 1251–1261
- Girke T, Todd J, Ruuska S, White J, Benning C, Ohlrogge J (2000) Microarray analysis of developing Arabidopsis seeds. *Plant physiology* 124: 1570–1581
- Goldberg RB, Paiva G De, Yadegari R (1994) *Plant Embryogenesis: Zygote to Seed*. Science 266: 605–614
- Gong Y, Cui L, Minuk GY (1996) Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28s-ribosomal RNA gene expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md)* 23: 734–747
- Ha M, Pang M, Agarwal V, Chen ZJ (2008) Interspecies regulation of microRNAs and their targets. *Biochimica et biophysica acta* 1779: 735–742
- Hills MJ (2004) Control of storage-product synthesis in seeds. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 302–308
- Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 431–438
- Huang D, Koh C, Feurtado JA, Tsang EW, Cutler AJ (2013) MicroRNAs and their putative targets in *Brassica napus* seed maturation. *BMC genomics* 14: 140-152
- Jessop JP, Toelken HR (1986) *Flora of Australia. Part 1: Lycopodiaceae-osaceae*. South Australian Government Printing Division: Adelaide,
- Jian B, Liu B, Bi Y, Hou W, Wu C, Han T (2008) Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. *BMC molecular biology* 9: 59
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual review of plant biology* 57: 19–53
- Josh T. Cuperus, Noah Fahlgren and JCC (2011) Evolution and Functional Diversification of MIRNA Genes. *The Plant cell* 23: 431–442

- Keith K, Kraml M, Dengler NG, McCourt P (1994) *fusca3*: A Heterochronic Mutation Affecting Late Embryo Development in Arabidopsis. *The Plant cell* 6: 589–600
- Kidner C a, Martienssen R a (2005) The developmental role of microRNA in plants. *Current opinion in plant biology* 8: 38–44
- Körbes AP, Machado RD, Guzman F, Almerão MP, De Oliveira LFV, Loss-Morais G, Turchetto-Zolet AC, Cagliari A, Dos Santos Maraschin F, Margis-Pinheiro M, et al (2012) Identifying conserved and novel microRNAs in developing seeds of *Brassica napus* using deep sequencing. *PloS one* 7: e50663
- Kroj T, Savino G, Valon C, Giraudat J, Parcy F (2003) Regulation of storage protein gene expression in Arabidopsis. *Development (Cambridge, England)* 130: 65–73
- Kulcheski FR, Marcelino-Guimaraes FC, Nepomuceno AL, Abdelnoor RV, Margis R (2010) The use of microRNAs as reference genes for quantitative polymerase chain reaction in soybean. *Analytical biochemistry* 406: 185–192
- Kulcheski FR, Oliveira LFV De, Molina LG, Almerão MP, Rodrigues FA, Marcolino J, Barbosa JF, Stolf-moreira R, Nepomuceno AL, Marcelino-guimarães FC, et al (2011) Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses.
- Le BH, Cheng C, Bui AQ, Wagmaister J a, Henry KF, Pelletier J, Kwong L, Belmonte M, Kirkbride R, Horvath S, et al (2010b) Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 8063–8070
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843–854
- Li H, Dong Y, Yin H, Wang N, Yang J, Liu X, Wang Y, Wu J, Li X (2011) Characterization of the stress associated microRNAs in *Glycine max* by deep sequencing. *BMC plant biology* 11: 170-183
- Lim QE, Zhou L, Ho YK (2011) *snoU6* and *5S* are not reliable miRNA reference genes in neuronal differentiation. *199*: 32–43
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods San Diego Calif* 25: 402–408
- Lopez-Gomollon S, Mohorianu I, Szittyá G, Moulton V, Dalmay T (2012) Diverse correlation patterns between microRNAs and their targets during tomato fruit development indicates different modes of microRNA actions. *Planta* 236: 1875–87

- Lotan T, Ohto M, Yee KM, West M a, Lo R, Kwong RW, Yamagishi K, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (1998) Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93: 195–205
- Luerssen H, Kirik V, Herrmann P, Miséra S (1998) FUSCA3 encodes a protein with a conserved VP1/AB13-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 15: 755–64
- Maeo K, Tokuda T, Ayame A, Mitsui N, Kawai T, Tsukagoshi H (2009) An AP2-type transcription factor , WRINKLED1 , of *Arabidopsis thaliana* binds to the AW-box sequence conserved among proximal upstream regions of genes involved in fatty acid synthesis. 1: 476–487
- Megraw M, Baev V, Rusinov V, Jensen ST, Kalantidis K, Hatzigeorgiou AG (2006) MicroRNA promoter element discovery in Arabidopsis. *RNA (New York, NY)* 12: 1612–9
- Meinke DW, Franzmann LH, Nickle TC, Yeung EC (1994) Leafy Cotyledon Mutants of Arabidopsis. *The Plant cell* 6: 1049–1064
- Meng Y, Shao C, Wang H, Chen M (2011) The regulatory activities of plant microRNAs: a more dynamic perspective. *Plant physiology* 157: 1583–1595
- Molnár A, Schwach F, Studholme DJ, Thuenemann EC, Baulcombe DC (2007) miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* 447: 1126–1139
- Nambara E, Keith K, Mccourt P, Naito S (1995) A regulatory role for the ABI3 gene in the establishment of embryo maturation in Arabidopsis thaliana. 636: 629–636
- Naqvi AR, Sarwat M, Hasan S, Choudhury NR (2012) Biogenesis, functions and fate of plant microRNAs. *Journal of Cellular Physiology* 227: 1–23
- Nodine MD, Bartel DP (2010) MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes & Development* 24: 2678–2692
- Paolacci AR, Tanzarella O a, Porceddu E, Ciaffi M (2009) Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC molecular biology* 10: 11
- Parcy F, Valon C, Raynal M, Gaubier-Comella P, Delseny M, Giraudat J (1994) Regulation of gene expression programs during Arabidopsis seed development: roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. *The Plant cell* 6: 1567–82

Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current biology* : CB 12: 1484–95

Pasquinelli a E, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Müller P, et al (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408: 86–9

Pfaffl MW, Hageleit & M (2001) Validities of mRNA quantification using recombinant RNA RT-PCR, recombinant DNA external calibration curves in real-time. *Biotechnology Letters* 23: 275–282

Raz V, Bergervoet JH, Koornneef M (2001) Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development (Cambridge, England)* 128: 243–52

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli a E, Bettinger JC, Rougvié a E, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403: 901–6

Sieber P, Wellmer F, Gheyselinck J, Riechmann JL, Meyerowitz EM (2007) Redundancy and specialization among plant microRNAs: role of the MIR164 family in developmental robustness. *Development (Cambridge, England)* 134: 1051–60

Song Q-X, Liu Y-F, Hu X-Y, Zhang W-K, Ma B, Chen S-Y, Zhang J-S (2011) Identification of miRNAs and their target genes in developing soybean seeds by deep sequencing. *BMC plant biology* 11: 5

Still David W and Kent J. Bradford (1998) Using hydrotime and ABA-time models to quantify seed quality of brassicas during development. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123: 692–699

Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2001) LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 11806–11

Sunkar R, Girke T, Jain PK, Zhu J (2005) Cloning and Characterization of MicroRNAs from Rice. *The Plant Cell* 17: 1397–1411

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, Borman B De, Coumans B (1999) Housekeeping genes as internal standards : use and limits. 75: 291–295

Thiebaut F, Rojas C a, Almeida KL, Grativol C, Domiciano GC, Lamb CRC, Engler JDA, Hemery AS, Ferreira PCG (2012) Regulation of miR319 during cold stress in sugarcane. *Plant, cell & environment* 35: 502–12

To A, Valon C, Savino G, Guillemot J, Devic M, Giraudat J, Parcy F (2006) A Network of Local and Redundant Gene Regulation Governs Arabidopsis Seed Maturation. *The Plant Cell* 18: 1642–1651

Tomm, GO (2000) Situação atual e perspectivas da canola no Brasil. Passo Fundo: Embrapa Trigo. Comunicado Técnico On-line, 58

Troncoso-Ponce MA, –, Thrower NA, 2, 3, 4 *, Ohlrogge and JB (2011) Comparative deep transcriptional profiling of four developing oilseeds. *The Plant Journal* 68: 1014–1027

Tsuchiya Y, Nambara E, Naito S, McCourt P (2004) The FUS3 transcription factor functions through the epidermal regulator TTG1 during embryogenesis in Arabidopsis. *The Plant Journal* 37: 73–81

USDA Oilseeds: World Market and Trade. In Circular Series: U.S. Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, (2011) pp. 1-33.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3: RESEARCH0034

Vicente-Carbajosa J, Carbonero P (2005) Seed maturation: developing an intrusive phase to accomplish a quiescent state. *The International journal of developmental biology* 49: 645–51

Vicient CM, Bies-Etheve N, Delseny M (2000) Changes in gene expression in the leafy cotyledon1 (*lec1*) and *fusca3* (*fus3*) mutants of *Arabidopsis thaliana* L. *Journal of experimental botany* 51: 995–1003

Voinnet O (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136: 669–87

Wang H (2012) Small RNA Profiling in Two *Brassica napus* Cultivars Identifies MicroRNAs with Oil Production- and Development-Correlated Expression and New Small RNA Classes. *Plant physiology* 158: 813–823

West M, Harada JJ (1993) Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. *The Plant cell* 5: 1361–1369

West M, Yee KM, Danao J, Zimmerman JL, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (1994) LEAFY COTYLEDON1 Is an Essential Regulator of Late Embryogenesis and Cotyledon Identity in Arabidopsis. *The Plant cell* 6: 1731–1745

Willmann MR, Mehalick AJ, Packer RL, Jenik PD (2011) MicroRNAs Regulate the Timing of Embryo Maturation in Arabidopsis1[W][OA]. *Plant Physiology* 155: 1871–1884

Wu C-I, Shen Y, Tang T (2009) Evolution under canalization and the dual roles of microRNAs: a hypothesis. *Genome research* 19: 734–743

Wu L, Zhou H, Zhang Q, Zhang J, Ni F, Liu C, Qi Y (2010) DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Molecular cell* 38: 465–75

Xu MY, Dong Y, Zhang QX, Zhang L, Luo YZ, Sun J, Fan YL, Wang L (2012) Identification of miRNAs and their targets from *Brassica napus* by high-throughput sequencing and degradome analysis. *BMC genomics* 13: 421

Yang T, Xue L, An L (2007) Functional diversity of miRNA in plants. *Plant Science* 172: 423–432

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson T a (2006) Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Developmental biology* 289: 3–16

5. ANEXO

Identifying Conserved and Novel MicroRNAs in Developing Seeds of *Brassica napus* Using Deep Sequencing

Ana Paula Körbes^{1,2}, Ronei Dorneles Machado², Frank Guzman¹, Mauricio Pereira Almerão², Luiz Felipe Valter de Oliveira¹, Guilherme Loss-Morais², Andreia Carina Turchetto-Zolet^{1,2}, Alexandro Cagliari¹, Felipe dos Santos Maraschin^{1,3}, Marcia Margis-Pinheiro^{1,2}, Rogerio Margis^{1,2,4*}

1 PPGGBM, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **2** PPGBCM, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **3** Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **4** Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are important post-transcriptional regulators of plant development and seed formation. In *Brassica napus*, an important edible oil crop, valuable lipids are synthesized and stored in specific seed tissues during embryogenesis. The miRNA transcriptome of *B. napus* is currently poorly characterized, especially at different seed developmental stages. This work aims to describe the miRNAome of developing seeds of *B. napus* by identifying plant-conserved and novel miRNAs and comparing miRNA abundance in mature versus developing seeds. Members of 59 miRNA families were detected through a computational analysis of a large number of reads obtained from deep sequencing two small RNA and two RNA-seq libraries of (i) pooled immature developing stages and (ii) mature *B. napus* seeds. Among these miRNA families, 17 families are currently known to exist in *B. napus*; additionally 29 families not reported in *B. napus* but conserved in other plant species were identified by alignment with known plant mature miRNAs. Assembled mRNA-seq contigs allowed for a search of putative new precursors and led to the identification of 13 novel miRNA families. Analysis of miRNA population between libraries reveals that several miRNAs and isomiRNAs have different abundance in developing stages compared to mature seeds. The predicted miRNA target genes encode a broad range of proteins related to seed development and energy storage. This work presents a comparative study of the miRNA transcriptome of mature and developing *B. napus* seeds and provides a basis for future research on individual miRNAs and their functions in embryogenesis, seed maturation and lipid accumulation in *B. napus*.

Citation: Körbes AP, Machado RD, Guzman F, Almerão MP, de Oliveira LFV, et al. (2012) Identifying Conserved and Novel MicroRNAs in Developing Seeds of *Brassica napus* Using Deep Sequencing. PLoS ONE 7(11): e50663. doi:10.1371/journal.pone.0050663

Editor: Michael Schubert, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France

Received: May 24, 2012; **Accepted:** October 24, 2012; **Published:** November 30, 2012

Copyright: © 2012 Körbes et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by CAPES, CNPq, CNPq-Universal 472575/2011-2, Genoprot-CNPq-MCT 559636/2009-1, Agroestruturante-FAPERGS-FINEP. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rogerio.margis@ufrgs.br

Introduction

Eukaryotic gene expression is regulated at the transcriptional and post-transcriptional levels. An important post-transcriptional mechanism that has recently been discovered is controlled by endogenous, noncoding small RNAs (sRNAs), primarily small interfering RNAs (siRNAs) and microRNAs (miRNAs) [1–4]. In plants, miRNA genes, called primary miRNAs (pri-miRNAs), are typically encoded in intergenic regions and are transcribed by RNA Polymerase II as long polyadenylated transcripts, similar to protein-coding genes [5]. These primary sequences contain an imperfect stem-loop structure that is recognized by DICER-Like1 (DCL1) for sequential cleavage, which converts the pri-miRNAs into the precursor sequences (pre-miRNAs) that are further processed to generate 18–24 nucleotide (nt)-long sequences called mature miRNAs [6]. The imperfect complementary strand to the most abundant miRNA is often called miRNA*, and both strands are originated from the 5p and 3p arms of the pre-miRNA hairpin structure. These sRNAs play critical roles during plant develop-

ment, regulating a variety of processes, such as embryogenesis, seed germination, organ formation, and developmental timing and patterning [7–13]. The binding of the miRNA to mRNA targets leads to gene silencing by endonucleolytic cleavage or translational inhibition, depending on the degree of complementarity between the miRNA and its target transcript [14–18].

Brassica napus, known as Oilseed Rape, is the third most important edible oil crop worldwide (www.faostat.fao.org). During embryogenesis, *B. napus* seeds build up storage reserves in specific tissues. The vast majority of these reserves are made up of lipids (40–45%) and proteins (17–26%) that are almost exclusively stored in the cotyledons of the maturing embryo [19]. Biogenesis of oil bodies (lipid-containing structures) begins as early as the heart stage in embryogenesis and lipid accumulation rapidly increases during weeks 4–8 after anthesis [20,21]. These developmental stages are correlated with high synthetic lipid activity and a decline in the expression of genes coding for oil biosynthetic and glycolytic enzymes but not of the genes involved in the later steps of oil accumulation [22].

