

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**SELEÇÃO DE GENES-REFERÊNCIA PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO  
GÊNICA EM MACIEIRAS**

Dissertação de Mestrado

**Pâmela Perini**

Porto Alegre, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**SELEÇÃO DE GENES-REFERÊNCIA PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO  
GÊNICA EM MACIEIRAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

**Pâmela Perini**

Orientadores: Prof. Dr. Giancarlo Pasquali  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Pinheiro Márgis  
Co-orientador: Dr. Luís Fernando Revers

Porto Alegre, Fevereiro de 2011.

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Márcio Alves Ferreira

Laboratório de Genética Molecular Vegetal, Departamento de Genética  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciane M. Pereira Passaglia

Laboratório de Genética Molecular Vegetal, Departamento de Genética  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Prof. Dr. Charley Christian Staats

Membro interno do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Prof. Dr. Diego Bonato

Membro suplente da Banca Examinadora  
Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal, no Centro Técnico da Embrapa Uva e Vinho. Recebeu auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

## **AGRADECIMENTOS**

A Aquele, bem maior do que eu, que sempre me rege, me guarda e me ilumina, pelos meus 25 anos...

A meus pais, pelo amor eterno e incondicional, pelo incentivo e confiança, pelo exemplo de uma vida com equilíbrio entre a dedicação ao trabalho e à família...

À minha irmã, pelo apoio e cumplicidade, pelos cafés da manhã e chocolates, por me mostrar que sofro de TPM, e por ser você, porque assim eu sou eu...

A Gian, meu 1º orientador e tutor, por me inserir no mundo da pesquisa científica, por me contagiar com o instigante desafio da biologia molecular vegetal, pelos aprendizados e pela confiança...

A Luís, pela oportunidade de acompanhar e contribuir com os trabalhos da EMBRAPA, especialmente através desta pesquisa, pela imensa paciência quando da minha teimosia, e pelos conhecimentos transmitidos...

À Márcia, pela atenção e prontidão em ajudar, pelas produtivas discussões, e pelos saberes compartilhados...

A todos os Professores da Banca Examinadora, pela disponibilidade, pelas críticas e sugestões...

À CAPES, pela bolsa de estudo-pesquisa-trabalho-sustento-formação-produção...  
A FINEP e EMBRAPA pelo financiamento à pesquisa... E aqueles que de alguma forma permitiram tantas viagens subindo e descendo a serra gaúcha...

Ao PPGBCM, ao CBiot e à UFRGS, pela qualidade que exigem e que formam...  
Obrigada especialmente a Arthur e Rogério, minha Comissão de Acompanhamento, pela atenção despendida, e a Sílvia e Luciano, pela agilidade em tudo...

A EMBRAPA Uva e Vinho, pela experiência que me foi oferecida...

Obrigada especialmente aos Pesquisadores Henrique, Bello, Ana, Paulo e Gilmar (além do Luís Fernando, claro!), pelo carinho e conhecimentos. Obrigada também aos colegas de laboratório, do LBMV: Vanessa (valeu pela ajuda, amiga!), Vítor (você merece muito sucesso, guri!), Diogo, Sabrina, Gisele, Aline, Gabriel, Rafaela; e da Fisiologia Vegetal: Daniel, Marcelo, Leonardo e Rafael (querido, obrigada pelo companheirismo de sempre!) – pela trocas, nos experimentos e convívio...

Ao Curso de Férias PPGBCM, pela oportunidade de realizar, de forma voluntária, aquilo no qual acredito: formar jovens e professores críticos e criativos...

Obrigada especialmente à Prof<sup>a</sup>. Célia, pela confiança; ao grupo do Prof. Leopoldo de Meis, UFRJ, pela iniciativa, acolhida e formação; à Carol, pela cumplicidade plena (amiga, estou muito orgulhosa de nós!)...

Aos meus queridos amigos: barra 2003/1, formandos 2008/2, EJA, EJOC, Tropa do Elite, e aqueles que o acaso fez com que nossos caminhos se cruzassem (Eder, um “Obrigada!” especial a você!) – pelo apoio e torcida, pela festas e gargalhadas, por compartilharmos angústias e desafios, enfim... por aquilo que chamamos de amizade!...

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES</b> .....	<b>9</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1. CULTURA DA MACIEIRA NO BRASIL.....	13
1.2. DORMÊNCIA.....	14
1.3. GENOMA DA MACIEIRA E OUTRAS FERRAMENTAS GENÉTICAS.....	15
1.4. REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE DE FORMA QUANTITATIVA.....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>3. PARTE I</b> .....	<b>22</b>
<b>MANUSCRITO: “REFERENCE GENE SELECTION FOR GENE EXPRESSION STUDIES IN APPLE”</b> .....	<b>22</b>
ABSTRACT.....	24
BACKGROUND.....	25
RESULTS.....	27
<i>PCR efficiency and specificity</i> .....	27
<i>Expression profiling of candidate reference genes</i> .....	27
<i>GeNorm and NormFinder analyses</i> .....	29
<i>Reference gene validation</i> .....	33
DISCUSSION .....	36
CONCLUSIONS .....	39
METHODS.....	40
<i>Plant material</i> .....	40
<i>RNA isolation and quality controls</i> .....	40
<i>Reverse transcription</i> .....	41
<i>Candidate genes selection</i> .....	41
<i>Primer design and efficiency</i> .....	42
<i>Quantitative PCR</i> .....	42
<i>Data analyses</i> .....	43
<i>Reference gene validation</i> .....	44
AUTHORS' CONTRIBUTIONS.....	45
ACKNOWLEDGEMENTS .....	45

REFERENCES.....	46
<b>ADDITIONAL FILE 1</b> .....	<b>52</b>
<b>ADDITIONAL FILE 2</b> .....	<b>53</b>
<b>ADICIONAL FILE 3</b> .....	<b>55</b>
<b>4. PARTE II</b> .....	<b>56</b>
<b>CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL TRANSCRICIONAL EM GEMAS DE CULTIVARES DE MACIEIRA CONTRASTANTES PARA A EXIGÊNCIA DE FRIO DURANTE A DORMÊNCIA HIBERNAL</b> .....	<b>56</b>
4.1. INTRODUÇÃO.....	56
4.1.1. <i>Dormência</i> .....	57
4.1.2. <i>Mecanismos moleculares da endodormência</i> .....	59
4.1.3. <i>Genes DAM e dados prévios do grupo</i> .....	61
4.1.4. <i>Objetivo específico</i> .....	63
4.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	64
4.2.1. <i>Material vegetal</i> .....	64
4.2.2. <i>Extração de DNA</i> .....	64
4.2.3. <i>Extração de RNA e Síntese de cDNA</i> .....	65
4.2.4. <i>Projeção de primers e teste de eficiência</i> .....	65
4.2.5. <i>Reação em cadeia da DNA Polimerase (PCR)</i> .....	66
4.2.6. <i>PCR quantitativa precedida de transcrição reversa (RT-qPCR) e análise dos dados</i> .....	66
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	66
4.4. PERSPECTIVAS .....	73
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>74</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>76</b>
<b>ANEXO I – CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>87</b>



**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES**

%	por cento
°C	graus Célcius
cDNA	DNA complementar
DNA	ácido desoxirribonucleico
ha	hectares
HF	horas de frio
Mb	mega pares de bases ( $10^6$ pb)
RNA	ácido ribonucléico
mg	miligrama
min	minutos
mm	milímetros
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
pb	pares de bases nucleotídicas
PCR	reação em cadeia da DNA polimerase
rpm	rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
RT-qPCR	PCR quantitativa precedida de transcrição reversa
s	segundos
SC	Santa Catarina
t	toneladas
U	unidade enzimática
µg	micrograma
µL	microlitros
µM	micromolar

## RESUMO

A macieira (*Malus x domestica*) é uma das mais importantes frutíferas do mundo, e sua produção tem destaque na região sul do Brasil. Comparações entre padrões de expressão gênica de diferentes variedades constituem uma estratégia de alto valor científico para seu melhoramento genético. Contudo, a acurácia das análises é dependente de genes de referência estáveis para a normalização dos dados. A escolha de controles inapropriados pode resultar em determinações estatísticas e conclusões incorretas. Pelo presente trabalho, teve-se como objetivo selecionar os melhores genes-referência para estudos de expressão gênica em macieiras, via reação em cadeia da DNA polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa (RT-qPCR). A expressão de 21 genes, incluindo tradicionais “*housekeeping genes*” ou genes sugeridos como constitutivos por dados de microarranjos disponíveis na literatura, foram avaliados em diferentes tecidos vegetativos e reprodutivos da cultivar ‘Gala’ de macieira. Para todos os genes, as combinações de *primers* testadas permitiram amplificações específicas e curvas de eficiência apropriadas. A estabilidade dos genes foi determinada por dois diferentes algoritmos estatísticos, *geNorm* e *NormFinder*. Os resultados permitiram concluir que, para os tecidos e condições avaliadas, *EF1 $\beta$* , *MDH*, *SAND*, *THFS* e *WD40* são os melhores genes normalizadores para quantificação relativa da abundância de transcritos de interesse em diferentes tecidos-alvos de macieira. A expressão de *PAL* foi utilizada para validação dos controles selecionados. Combinações específicas de dois ou três genes-referência demonstraram ser suficientes para a normalização dos dados em cada conjunto de amostras analisado. Finalmente, a expressão do gene *MDP0000232313* ou *MdDAM6*, potencial gene *MADS-box* associado à dormência em macieira, foi avaliada em gemas da cultivar ‘Fuji Standard’, amostradas durante o ciclo vegetativo e de dormência das plantas ao longo do ano 2009. As análises foram conduzidas via RT-qPCR e de forma relativa aos genes *EF1 $\beta$*  e *WD40*. Observou-se um nível basal de expressão de *MdDAM6* durante o verão e um aumento de cerca de 10 vezes no inverno, refletindo sua possível função no estabelecimento e/ou manutenção do estado endodormente das gemas de macieira, uma vez que este tenha sido estabelecido.

## ABSTRACT

Apple (*Malus x domestica*) is one of the most important fruit tree crop in the world, and its production is prominent in southern Brazil. Comparisons among profiles of gene expression from different cultivars are valuable scientific tools for apple genetic breeding. However, the accuracy of the analyses is dependent on the evaluation of stable reference genes for data normalization. The inappropriate choice of controls may result in statistical significance undue or incorrect conclusions. In the present work, the objective was to select the best reference genes for gene expression studies by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in apple trees. The expression of 21 genes, including traditional housekeeping or genes suggested as constitutive by microarray data available in the literature, was evaluated in different vegetative and reproductive tissues of the apple 'Gala' cultivar. For all genes, tested combinations of primers allowed specific amplification and suitable efficiency curves. The stability of the genes was determined by two different statistical algorithms, *geNorm* and *NormFinder*. The results allowed us to conclude that, for tissues and conditions evaluated, *EF1 $\beta$* , *MDH*, *SAND*, *THFS* and *WD40* are the best normalizing genes for relative quantification of interest transcript abundance in different target tissues of apple. *PAL* expression was used to validate the selected normalizers. Specific combinations of two or three reference genes were shown to be sufficient to normalize each apple sample set analyzed. Finally, the *MDP0000232313* or *MdDAM6* gene expression, a potential *MADS-box* gene associated with dormancy in apple, was evaluated in buds of the apple 'Fuji' cultivar, sampled in the vegetative and dormant cycle of plants during the year of 2009. The analysis was performed by RT-qPCR and quantified in relation to the *EF1 $\beta$*  and *WD40* normalizing genes. It a basal level of expression was observed during summer and a ten fold increase during winter, reflecting its possible function associated with the establishment and/or maintenance of the endodormant state of apple buds, once it has been established.

## 1. INTRODUÇÃO

A família botânica Rosaceae é representada por aproximadamente 3.000 espécies de plantas, em sua maioria, típicas de clima temperado. A família tem rica variedade morfológica e contém espécies arbóreas, herbáceas e arbustivas. Muitos de seus membros como, por exemplo, maçã, framboesa, morango, pera, cereja, ameixa, damasco e pêsego, são identificados por seus frutos sazonais comestíveis, valorizados por seus sabores únicos, cores e propriedades nutritivas; outros, por sua utilização ornamental (rosas), ou produção de nozes (amêndoas) (FOLTA & GARDINER, 2009).

A macieira (*Malus x domestica* Borkh.) é uma das frutíferas mais cultivadas no mundo desde a antiguidade (KELLERHALS, 2009). Pelas evidências mais recentes, ratificou-se a espécie selvagem *Malus sieversii* como o principal progenitor da macieira doméstica (VELASCO *et al.*, 2010), sendo a Ásia Central considerada seu centro de diversidade e dispersão (FOLTA & GARDINER, 2009). A maçã pode ser consumida como fruto fresco ou processada em doces, geléias, compotas, sucos, bebidas alcoólicas e vinagre. Apresenta um alto valor nutricional principalmente pela presença de pectina, potássio, fósforo, ferro, vitamina C, vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina e ácido pantotênico) e flavonóides (DAVEY *et al.*, 2006; LATA, 2007; USDA, 2010).

Mais de 7.500 cultivares de macieira são reconhecidas atualmente. Uma grande variedade de estudos silviculturais, fisiológicos, genômicos e genéticos está sendo conduzida por grupos de pesquisa em todo o mundo, visando melhorar a competitividade econômica das culturas de macieiras e melhor compreender os princípios biológicos que controlam as diversas características agrônômicas dessas plantas (LABUSCHAGNÉ *et al.*, 2002; JUNG *et al.*, 2008; KOUASSI *et al.*, 2009; VELASCO *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2010).

O Brasil também faz parte do cenário mundial dessa frutífera, ocupando a 12ª posição entre os maiores produtores mundiais, produzindo atualmente mais de 1 milhão de toneladas de maçãs por ano, com uma cultura bem estabelecida na Região Sul do país (MELLO *et al.*, 2007). Tal posição exige, também, contínuo investimento no estudo e no melhoramento da pomicultura nacional.

## 1.1. CULTURA DA MACIEIRA NO BRASIL

Os primeiros investimentos em pomares comerciais brasileiros surgiram na região de Fraiburgo (SC), em 1969, atraídos pela Lei de Incentivos Fiscais para Reflorestamento, que incluiu a macieira no programa. Até então, havia apenas pomares domésticos cultivados por imigrantes europeus, e toda maçã de qualidade ainda era importada da Argentina (FERREIRA, 2009). Em 30 anos, a produção de maçãs aumentou em quantidade e em qualidade, fazendo com que o país passasse de importador a autossuficiente e com potencial de exportação. Além de ser um dos mais significativos exemplos de êxito alcançado no setor frutícola nacional, a cadeia produtiva da maçã foi pioneira na implantação do Sistema de Produção Integrada (PI) no Brasil (FERREIRA, 2009). A PI pressupõe o emprego de tecnologias que permitam o controle efetivo do sistema produtivo agropecuário por meio do monitoramento de todas as etapas, desde a aquisição dos insumos até a oferta ao consumidor, com mecanismos reguladores que assegurem uma produção agrária sustentável (EMBRAPA UVA E VINHO, 2003; FERREIRA, 2009).

Levantamentos da Associação Brasileira de Produtores de Maçãs (ABPM) revelam que, na safra de 2001, aproximadamente 2.700 produtores estiveram envolvidos e a área plantada foi de cerca de 30.000 ha, com produção estimada de 800.000 t. Esses dados evidenciam o sucesso da cultura, considerando a produção de apenas 1.000 t anuais no início da década de 70 (EMBRAPA UVA E VINHO, 2003). Com relação à exportação de frutas frescas nacionais, a maçã ocupou, na safra 2007/2008, o 4º lugar em valor e o 2º lugar em volume, alcançando um índice superior a 10% da quantidade total dos frutos produzidos encaminhados para o mercado externo (IBRAF, 2009).

Hoje, cerca de 99% da maçã do Brasil é cultivada abaixo do Trópico de Capricórnio. O estado de Santa Catarina responde por 52% da produção nacional, seguido do Rio Grande do Sul (43%) e do Paraná (4%) (MELLO *et al.*, 2007; FERREIRA, 2009; IBRAF, 2009). Os três grandes pólos produtores são Vacaria (RS), São Joaquim e Fraiburgo (SC) (MELLO *et al.*, 2007; FERREIRA, 2009). As cultivares 'Gala' e 'Fuji' possuem qualidades organolépticas que agradam o paladar do consumidor brasileiro e, por isso, constituíram-se, naturalmente, nas principais opções de cultivo. Na safra de 2009/2010, estima-se que essas duas cultivares e

clones de seus mutantes somáticos espontâneos responderam por 94,6% da produção de maçãs do país (FIORAVANÇO *et al.*, 2010).

A concentração da produção em poucas cultivares, no entanto, pode acarretar em: a) perda da diversidade genética e de características preservadas ao longo de gerações por seleção das cultivares adaptadas a cada zona produtora (IGLESIAS *et al.*, 2009); b) concentração da produção em um curto período de tempo; c) dificuldade para o gerenciamento dos pomares e das casas de beneficiamento; d) maior vulnerabilidade a pragas e doenças; e e) maior risco de perdas devido à ocorrência de eventos climáticos adversos em determinados estádios de desenvolvimento (FIORAVANÇO *et al.*, 2010). Problemas associados à não-satisfação do requerimento de frio hibernal de algumas cultivares, em virtude das grandes oscilações térmicas no Sul do Brasil ou da ocorrência de invernos mais brandos (PETRI, 1997), poderiam ser contornados pela utilização de cultivares com menores exigências de frio para regulação da dormência.

## 1.2. DORMÊNCIA

Para que a macieira inicie um novo ciclo vegetativo na primavera, é necessário que a planta seja exposta a um período de baixas temperaturas durante o inverno, para superação da dormência, estado gerado pela própria planta como mecanismo de tolerância às condições climáticas desfavoráveis. Caso esta necessidade de frio não seja satisfeita, as plantas apresentam atrasos e irregularidades na brotação e floração, o que compromete a produção dos frutos (PETRI *et al.*, 2002; LANG *et al.*, 1987).

Muitos esforços foram empregados na procura por tratamentos químicos para promover a quebra de dormência, visando a obtenção de florescimento homogêneo (PETRI, 1997; BOTELHO & MÜLLER, 2007). Alguns compostos como o óleo mineral e a cianamida hidrogenada ( $H_2CN_2$ ) são atualmente recomendados para a indução da quebra de dormência da macieira no Brasil (PETRI *et al.*, 2002). O aumento das restrições no uso de substâncias químicas sintéticas com elevado grau de toxicidade, como a cianamida hidrogenada, em sistemas de produção sustentáveis, vem gerando falta de alternativas para a indução de quebra de dormência na macieira, fato que se pode tornar uma limitação importante para a

produção de maçã em regiões de invernos amenos, como o sul do Brasil. Adicionalmente, os impactos das mudanças climáticas globais, tendo como consequência o aumento da temperatura média em diversas regiões do planeta, têm estimulado a utilização e o ajuste de modelos experimentais para prever o acúmulo de frio e auxiliar no manejo de pomares comerciais (LEGAVE *et al.*, 2008). Em países tradicionalmente produtores de maçã, a utilização desses modelos já permitiu verificar a mudança de comportamento fenológico de cultivares de macieira frente ao aumento médio da temperatura registrado na última década.

A quantidade de frio para superar a dormência é diferente entre espécies e entre cultivares vegetais (HAUAGGE & CUMMINS, 1991). De modo geral, o acúmulo de horas de frio (HF) tem sido relacionado ao somatório de horas nas quais a planta fica exposta a temperaturas abaixo de 7,2 °C (RICHARDSON *et al.*, 1974). Considerando regiões de clima subtropical, como a Região Sul do Brasil, dependendo do genótipo, outras temperaturas e/ou tempos de exposição podem ser eficazes para a superação da dormência. Por exemplo, as cultivares de macieiras *standard* 'Gala' e 'Fuji' dependem de 700 a 800 HF para liberação das gemas desse estado de repouso (CAMILO & DENARDI, 2006), enquanto suas cultivares mutantes respectivas, 'Castel-Gala' e 'Fuji-Fray', caracterizam-se por exigirem cerca de 400 a 500 HF para a superação de dormência das gemas (DENARDI & SECCON, 2005; Frederico Denardi, comunicação pessoal). Portanto, a obtenção de novas cultivares de macieira adaptadas às condições climáticas sul-brasileiras é dependente da implantação de ferramentas biotecnológicas aplicáveis ao estudo e ao melhoramento genético da macieira.

### 1.3. GENOMA DA MACIEIRA E OUTRAS FERRAMENTAS GENÉTICAS

O genoma da cultivar de macieira 'Golden Delicious' foi recentemente publicado (VELASCO *et al.*, 2010). A pesquisa desenvolvida por quase 20 instituições em um consórcio internacional teve por resultado 603,9 Mb reunidos em *contigs*, representando uma cobertura de 81,3% do genoma. O número de genes preditos para esta macieira, 57.386, é o maior relatado para plantas. Dentre as famílias gênicas, parece haver um subclado de genes codificantes de fatores de transcrição do tipo *MADS-box* específico de macieira, sobre o qual se especula a

regulação da determinação floral e do desenvolvimento do fruto (VELASCO *et al.*, 2010). O pomo, fruto característico da tribo Pyreae, é um dos aspectos mais intrigantes da biologia da maçã (POTTER *et al.*, 2007). Genes relacionados ao metabolismo do sorbitol fazem parte de um segundo grupo de genes super-representados no genoma da macieira e, novamente, fazem menção ao fruto, quanto à sua composição (VELASCO *et al.*, 2010). Em Rosaceae, carboidratos derivados da fotossíntese são transportados principalmente na forma de sorbitol, uma glicose hidratada.

Enquanto o número de cromossomos haplóides da maioria das Rosaceae varia de sete a nove, a tribo Pyreae apresenta 17. Análises par-a-par entre os 17 grupos de ligação reconstruídos quando do mapeamento genômico indicaram fortes colinearidades entre alguns cromossomos. Essas relações permitiram elaborar a hipótese de que uma duplicação genômica recente, há pelo menos 50 milhões de anos, com translocações e uma disploidia por perda de um cromossomo, teria resultado na transição de um conjunto com nove cromossomos ancestrais para o conjunto com 17 cromossomos em Pyreae (VELASCO *et al.*, 2010).

A disponibilidade do acesso ao genoma da macieira (<http://genomics.research.iasma.it/>) contribuiu como uma importante ferramenta para o estudo dessa e de outras Rosaceae, ou frutos de climas temperados. Tal estratégia complementa as informações de bancos de dados gerados por bibliotecas de etiquetas de sequências expressas (ESTs). O primeiro trabalho para macieira foi realizado por NEWCOMB e colaboradores (2006), onde foram sequenciados 151.687 cDNAs de diferentes tecidos em diversos estádios de desenvolvimento das cultivares 'Royal Gala', 'Pinkie' e 'Pacific Rose'.

Atualmente, existe uma série de bancos de dados públicos de ESTs disponíveis na Internet, sendo possível acessar, pelo uso de ferramentas de bioinformática, mais de 300.000 ESTs de macieira, representando diversos tipos de tecidos sob diferentes tratamentos. Os principais bancos de dados são do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *Genome Database for Rosaceae* (GDR; <http://www.rosaceae.org/>) e *Dana Farber Cancer Institute and Harvard School of Public Health* (DFCI; <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>).

Finalmente, o desenvolvimento de marcadores moleculares e o mapeamento de *loci* de traços quantitativos (QTLs) são importantes tecnologias genéticas para



acelerar programas de melhoramento em macieiras, investindo na seleção de genótipos com resistência a doenças ou pragas, qualidade e/ou capacidade de armazenamento do fruto, ausência de sementes, dentre outras características agronômicas de interesse (MARIC *et al.*, 2010). Análises de expressão gênica também aparecem como estratégias fundamentais para o estudo da biologia dessa espécie e como suporte às ferramentas de melhoramento vegetal (BOUDICHEVSKAIA *et al.*, 2009; SOGLIO *et al.*, 2009; BHATTI & JHA, 2010).

#### 1.4. REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE DE FORMA QUANTITATIVA

A análise da expressão gênica dá suporte para uma melhor compreensão de rotas de sinalização e metabólicas de processos celulares e de desenvolvimento dos organismos. Métodos tradicionais de análise de RNA incluem *Northern blot*, hibridização *in situ*, reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) precedida de transcrição reversa (RT) convencional, ensaio de proteção à ribonuclease (*RNase protection assay*), microarranjo e RT-PCR quantitativa (RT-qPCR, ou RT-PCR em tempo-real; RADONIC *et al.*, 2004). A tecnologia da RT-qPCR está atualmente estabelecida como padrão-ouro para análises de expressão gênica de médio rendimento, em vista de sua acurácia, sensibilidade, ampla faixa de detecção e alta velocidade (DERVEAUX *et al.*, 2010).

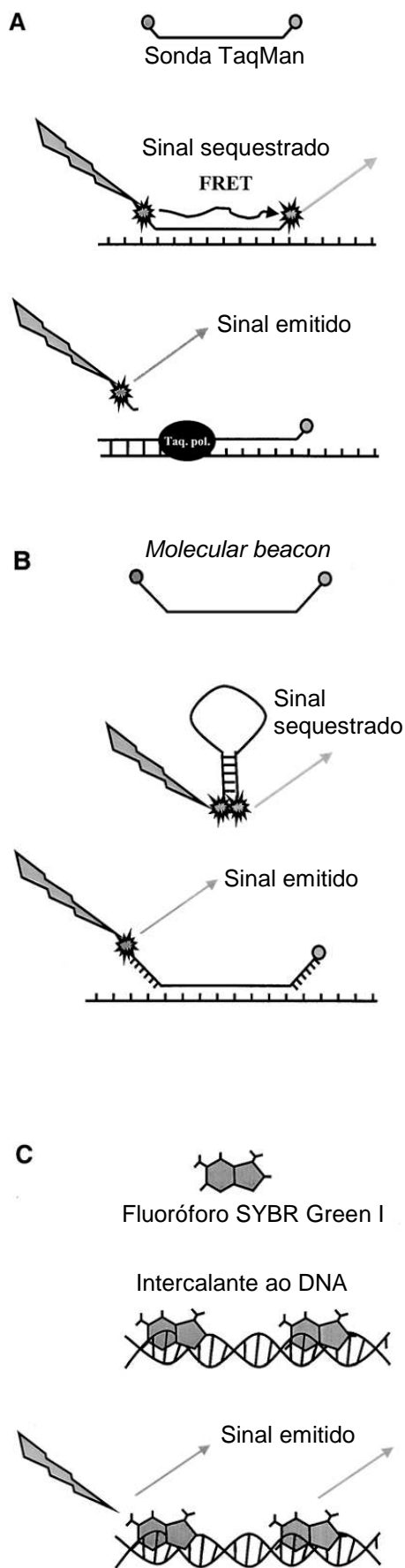
A RT-qPCR permite analisar o acúmulo de transcritos, resultante do balanço entre a atividade transcricional e o nível de degradação do RNA, ainda na fase exponencial da PCR (GINZINGER, 2002). Devido a inibidores da reação encontrados nas soluções do cDNA-molde ou a limitação de reagentes, eventualmente, a PCR converge da taxa exponencial de geração de cópias a uma fase de platô, e as quantidades de produtos finais podem não ser comparáveis entre reações. Durante a fase exponencial em experimentos de qPCR, é determinado um sinal fluorescente limite (*threshold*) em que todas as amostras podem ser comparadas (GINZINGER, 2002). Este limite é calculado em função da quantidade de fluorescência de fundo e é fixado em um ponto em que o sinal gerado a partir de uma amostra é significativamente maior do que a fluorescência de fundo (GINZINGER, 2002).

As químicas mais comuns empregadas para a fluorescência incluem ensaios de 5'-nucleases utilizando sondas TaqMan (Applied Biosystems; Fig. 1. A), *molecular beacons* (Fig. 1. B) e intercalantes de DNA como SYBR Green I, II ou SYBR Gold (Invitrogen; Fig. 1. C; GINZINGER, 2002). Em todos os casos, o sinal fluorescente gerado durante a PCR é capturado em um dos diferentes instrumentos de detecção acoplados aos termocicladores para qPCR.

O número fracionário de ciclos de amplificação necessários para gerar sinal fluorescente suficiente para atingir o limite é definido como o ciclo de limiar (Ct, *cycle threshold*) ou preferencialmente denominado ciclo de quantificação (Cq, *quantification cycle*) (BUSTIN *et al.*, 2009). Estes valores Cq são diretamente proporcionais à quantidade de cDNA-molde de partida e são a base para calcular os níveis de mRNA ou medições do número de cópias do DNA (WALKER, 2002; GINZINGER, 2002).

Para que os dados gerados por RT-qPCR sejam confiáveis, deve-se despender atenção e cuidados especiais no delineamento experimental, qualidade das amostras – incluindo pureza e integridade do RNA extraído, além de eficiente síntese de cDNA – e seleção de genes apropriados para a normalização dos dados (DERVEAUX *et al.*, 2010). A quantificação dos genes-referência, usada para a mensuração relativa de um gene-alvo, tem por finalidade remover eventuais desvios resultantes de artefatos técnicos, pois o gene-referência é exposto às mesmas condições e etapas de preparação que o gene de interesse. Dessa forma, pode-se isolar variações induzidas experimentalmente sobre as amostras ou variações técnicas sobre a quantidade de material nucleico amplificável, devido a diferenças na preparação do RNA ou do cDNA e na quantidade de cDNA-molde inicial (RADONIC *et al.*, 2004; DHEDA *et al.*, 2005; DERVEAUX *et al.*, 2010).

Um gene-referência ideal deve ser estavelmente expresso independente do tecido amostrado ou do tratamento experimental, e sua abundância deve apresentar forte correlação com a quantidade total de RNA presente na amostra (BUSTIN *et al.*, 2009). A utilização de um gene normalizador inapropriado pode tornar errôneas as



**Figura 1. Métodos usados na geração de fluorescência em experimentos de RT-qPCR.**

(A) Sonda TaqMan: a sonda é projetada para hibridizar ao DNA-molde entre os *primers* convencionais da PCR. Quando a sonda está íntegra, a molécula marcadora em 5' não emite fluorescência, pois esta é capturada por uma molécula sequestradora (*quencher*) próxima, em 3', via transferência de energia ressonante de fluorescência (FRET), que emite fluorescência em comprimento de onda diferente do desejado. O sinal fluorescente de interesse é gerado quando da atividade exonucleásica 5'-3' da *Taq* DNA polimerase, simultânea à geração de uma cópia do cDNA.

(B) *Molecular beacons*: é semelhante à sonda TaqMan, por utilizar um sequestrador para prevenir a fluorescência indesejada, embora por intermédio de uma transferência direta de energia. Entretanto, não exige uma atividade exonucleásica 5'-3', e apenas gera sinal quando pareado ao molde. O efeito de sequestro é gerado por uma alça na molécula devido à complementaridade entre as extremidades. Quando a sonda hibridiza ao cDNA-molde, a distância entre as moléculas em 5' e em 3' é suficientemente grande para minimizar o efeito de sequestro do sinal. Os dados devem ser analisados na fase de anelamento da PCR.

(C) Intercalante de DNA *SYBR Green I*: quando este método é usado, não há necessidade de projetar um terceiro oligonucleotídeo modificado ou uma sonda para hibridização. O sinal fluorescente apenas é possível quando a amostra é excitada pela fonte de luz e o marcador está ligado à molécula do DNA (possivelmente intercalado no sulco menor da dupla-fita de DNA). Este método é o de menor custo, mas o emprego de SYBR Green I não permite discriminar amplicons desejados em relação àqueles resultantes de artefatos da PCR.

(Adaptado de GINZINGER *et al.*, 2002.)

conclusões obtidas em um trabalho, pois a variabilidade na expressão do gene-referência pode significar diferenças significativamente relevantes nos resultados (DHEDA *et al.*, 2005). Comumente, são investigados, para tal função, genes envolvidos em processos celulares básicos (*housekeeping genes*), como metabolismo de açúcares (genes codificantes para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), de proteínas (*18S rRNA* e ubiquitina), atividade de citoesqueleto (actina e tubulina), dentre outros (RADONIC *et al.*, 2004; JAIN *et al.*, 2006).

Todavia, até o momento, a descrição de um único e universal gene-referência não foi apresentada. Portanto, os genes candidatos a normalizadores devem ser cuidadosamente selecionados e validados para cada situação experimental. A escolha e o número ótimo de genes-referência a serem utilizados podem ser orientados por alguns programas estatísticos, como o *geNorm* (VANDENSOMPELE *et al.*, 2002), *BestKeeper* (PFAFFL *et al.*, 2004) e *NormFinder* (ANDERSEN *et al.*, 2004).

Em plantas, diversos trabalhos foram desenvolvidos para a identificação dos melhores genes normalizadores em cada espécie ou condições estudadas. Como exemplos, pode-se citar álamo (BRUNNER *et al.*, 2004), cana-de-açúcar (ISKANDAR *et al.*, 2004), *Arabidopsis thaliana* (CZECHOWSKI *et al.*, 2005; REMANS *et al.*, 2008), batata (NICOT *et al.*, 2005), videira (REID *et al.*, 2006), arroz (JAIN *et al.*, 2006), algodoeiro (TU *et al.*, 2007; ARTICO *et al.*, 2010), soja (JIAN *et al.*, 2008; KULCHESKI *et al.*, 2010), tomate (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2008; LØVDAL & LILLO, 2009), café (BARSALOBRES-CAVALLARI *et al.*, 2009), pessegueiro (TONG *et al.*, 2009), tabaco (SCHMIDT & DELANEY, 2010) e eucalipto (DE ALMEIDA *et al.*, 2010). Em macieiras, porém, não há relatos a respeito dos genes mais estáveis a serem usados como referência em ensaios de expressão gênica.

## 2. OBJETIVOS

Com este trabalho, tem-se o objetivo de contribuir para a padronização da RT-qPCR como ferramenta precisa de análise da expressão gênica em macieira.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I) Avaliar uma coleção de candidatos a genes-referências visando selecionar os melhores normalizadores para os dados de expressão relativa de transcritos de interesse em diversos tecidos e estádios de desenvolvimento de órgãos vegetativos e reprodutivos de macieiras.
  
- II) Investigar os potenciais genes associados à dormência através da verificação de sua expressão ao longo de um ciclo anual completo de crescimento e dormência, em gemas de macieira.

### 3. PARTE I

*Manuscrito: "Reference gene selection for gene expression studies in apple"*

(A ser submetido ao periódico "*BMC Plant Biology*".)

## Reference gene selection for gene expression studies in apple

**Pâmela Perini<sup>1</sup>, Giancarlo Pasquali<sup>1</sup>, Márcia Márgis-Pinheiro<sup>2</sup>, Paulo Ricardo Dias de Oliveira<sup>3</sup>, Luís Fernando Revers<sup>3§</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), P.O. Box 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Núcleo de Genômica Funcional de Plantas, Departamento de Genética, UFRGS, P.O. Box 15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup>EMBRAPA Uva e Vinho, Laboratório de Genética de Plantas, P.O. Box 130, CEP 95700-000, Rua Livramento 515, Bento Gonçalves, RS, Brasil.

§Corresponding author

Email addresses:

PP: [pamela.perini@yahoo.com.br](mailto:pamela.perini@yahoo.com.br)

GP: [pasquali@cbiot.ufrgs.br](mailto:pasquali@cbiot.ufrgs.br)

MMP: [marcia.margis@ufrgs.br](mailto:marcia.margis@ufrgs.br)

PRDO: [paulo@cnpuv.embrapa.br](mailto:paulo@cnpuv.embrapa.br)

LFR: [luis@cnpuv.embrapa.br](mailto:luis@cnpuv.embrapa.br)

## ABSTRACT

**Background.** Apple (*Malus x domestica*) is the most important deciduous tree fruit crop grown around the world. Researches on apple genetic breeding include disease resistance mechanisms, grafting, chilling requirement, fruit ripening and production of nutraceutical compounds. Comparisons among profiles of gene expression of different tissues, conditions or cultivars are valuable scientific tools to better understand the genetic basis of important agronomical and forestry traits. However, the accuracy of techniques that provide these analyses is dependent on the evaluation of stable reference genes for data normalization, to avoid statistical significance undue or incorrect conclusions and characterizations. The objective of this work was to select the best genes to be used as references for gene expression studies by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in apple trees.

**Results.** Vegetative and reproductive tissues of the apple 'Gala' cultivar were evaluated during their seasonal cycle of growth and dormancy. It was investigated the expression of 21 genes, traditional housekeeping or suggested as constitutive genes by microarray data. For all these, tested combinations of primers allowed specific amplification and suitable efficiency curves for gene expression studies by RT-qPCR. The stability of the genes was determined by two different statistical descriptors, *geNorm* and *NormFinder*. The expression of *EF1 $\beta$* , *MDH*, *SAND*, *THFS* and *WD40* were the most stable through all samples. When only buds, dormant ones or after bud flush, were considered, *EF1 $\beta$* , *MDH* and *WD40* were again good internal controls. For young or mature leaves, both softwares allowed us to recommend *ACT11* and *TMp1* as the best reference genes. For the evaluation of fruit development stages, combined *CKL*, *SAND* and *TMp1* provided the best normalization. For fruit tissues, *ARC5*, *EF1 $\beta$*  and *SAND* were the most stable reference genes. *PAL* expression was used to validate selected normalizers.

**Conclusions.** We have tested the expression profiles of 21 candidate reference genes through dormant and open buds, flowers, young and expanded leaves, fruitset, skin and pulp of unripe and mature apple 'Gala' fruits. The evaluation by *geNorm* and *NormFinder* allowed us to suggest *EF1 $\beta$* , *MDH*, *SAND*, *THFS* and *WD40* as the best normalizing genes to accurately quantify relative transcript abundances using RT-qPCR in different target tissues of apple.



## BACKGROUND

Apple is the most important temperate fruit crop grown around the world. The tree requires a winter period, during which it is dormant. Blossoms are produced in spring simultaneously with the budding of leaves. Fruiting occurs in late spring and the harvest is done over summer. An intriguing aspect of the apple's biology concerns its characteristic fruit, the pome, which is found only in the Pyreae tribe [1]. Central Asia is the area of greatest apple diversity and the center of its origin [2]. The genus *Malus* (family Rosaceae) has 25-30 species, but there are more than 7,500 known cultivars [2]. The most important commercially produced apple cultivars belong to the species *Malus x domestica* Borkh. According to the Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, the world produced 70.1 million tons of apples in 2009, being China, United States of America, Turkey, Poland, Iran, Italy, India, France, Russian Federation, Chile, Argentina, Brazil and Germany the major producers [3].

Given its cultural and economic importance, apple has always received much attention from the scientific community, resulting in considerable progress in genetic and, more recently, in genomic research. The recent genome sequencing of the diploid apple cultivar 'Golden Delicious' [4] contributed significantly as an important tool for apple and other Rosaceae or temperate fruit crops studies. Associated with this, development of molecular markers and mapping quantitative trait loci also open doors for accelerate breeding programs of this important perennial crop species [5].

Researches on apple genetic breeding include disease resistance mechanisms [6], grafting [7], dormancy and chilling requirement [8, 9], fruit ripening [10] and production of nutraceutical compounds [11] as the most important characters to be genetically improved. Comparisons among gene expression profiles of different tissues, conditions or cultivars are valuable scientific tools to better understand the genetic basis of important agronomical traits for genetic improvement of apple trees. The total number of genes predicted from the apple genome reaches more than 57,000, being the highest gene number reported among plants so far [4]. Analyses using large scale strategies have been done by the generation of expressed sequence tags (ESTs) [12, 13] or microarrays [14-16]. It is expected that the understanding of the regulation and expression patterns of some key genes

concerned to apple development, physiology and biochemistry will help to unveil the mechanisms involved in each one of these processes.

To evaluate changes in gene expression, reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) is one of the most widely applied and sensitive methods. It is also an easily, automated, rapid, and high throughput quantitative technology [17]. Precisely because of its high sensitivity, qPCR is also very susceptible to variations [17]. So, the publication of the Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments, 'MIQE guidelines' [18], suggested a minimum set of information that researchers should provide for their qPCR data, focusing on the generation of more uniform, comparable and reliable data.

For RT-qPCR data to be reliable, it is necessary precise normalization. Normalization involves reporting the ratios of mRNA concentrations of the genes of interest to those of the reference genes [18]. The ideal reference genes should be constantly transcribed in all cell types and tissues, and their abundance should show strong correlation with the total amounts of mRNA present in samples [18, 19]. Genes involved in basic cellular processes, such as cell structure maintenance or primary metabolism, are often chosen as normalizers. However no single housekeeping gene is universal for all species or experiments. Some reports describe the identification of reference genes for expression studies using RT-qPCR in different plant species like poplar [20], sugarcane [21], *Arabidopsis thaliana* [22, 23], potato [24], grapevine [25], rice [26], cotton [27, 28], soybean [29, 30], tomato [31, 32], *Brachypodium distachyon* [33], *Lolium perenne* [34], coffee [35], peach [36], cucumber [37], logan tree [38], tobacco [39] and eucalyptus [40].

The lack of information in apple prompted us to evaluate a collection of candidate genes to be used as references for the purpose of normalization in apple gene expression studies by RT-qPCR.

## RESULTS

### PCR efficiency and specificity

A RT-qPCR assay, based on SYBR Green detection, was performed for the transcriptional profiling based on steady-state mRNA levels of 13 commonly used housekeeping genes (*ACT2*, *ACT1*, *ACTfam*, *EF1 $\alpha$* , *EF1 $\beta$* , *GAPDH*, *MDH*, *PP2A-1*, *PP2A-A3*, *SAND*, *TUB $\alpha$ 5*, *TUB $\beta$ 6* and *UBC10*) and other 10 potential normalizers deduced from public microarray analyses (*ARC5*, *C3HC4*, *CDC48*, *CKL*, *DLD*, *KEA1*, *PCS*, *THFS*, *TMp1* and *WD40*), in order to select a reliable set of reference genes in *Malus x domestica* expression studies. The list of genes and amplicon characteristics are presented in Table 1.

The 23 candidate gene primers were evaluated for their efficiencies (E) by a standard curve with serial dilutions of apple tissues cDNA pool. The correlation coefficient ( $R^2$ ) for all curves was superior than 0.99, and 21 out of the 23 primer pairs allowed an amplification efficiency between 1.89 and 2.04 (Table 1). When efficiency equals 100% or 2 ( $1 + \text{efficiency} = 2$ ), the whole target cDNA is duplicated at every PCR cycle during exponential phase. Considering that, the efficiency values obtained were acceptable and the amplification products of each reaction are comparable to each other. Only primer pairs *PP2A-A3* and *CDC48* were discarded because of their low or overestimated efficiencies during the respective reactions. Thus, 21 genes were evaluated in the following steps.

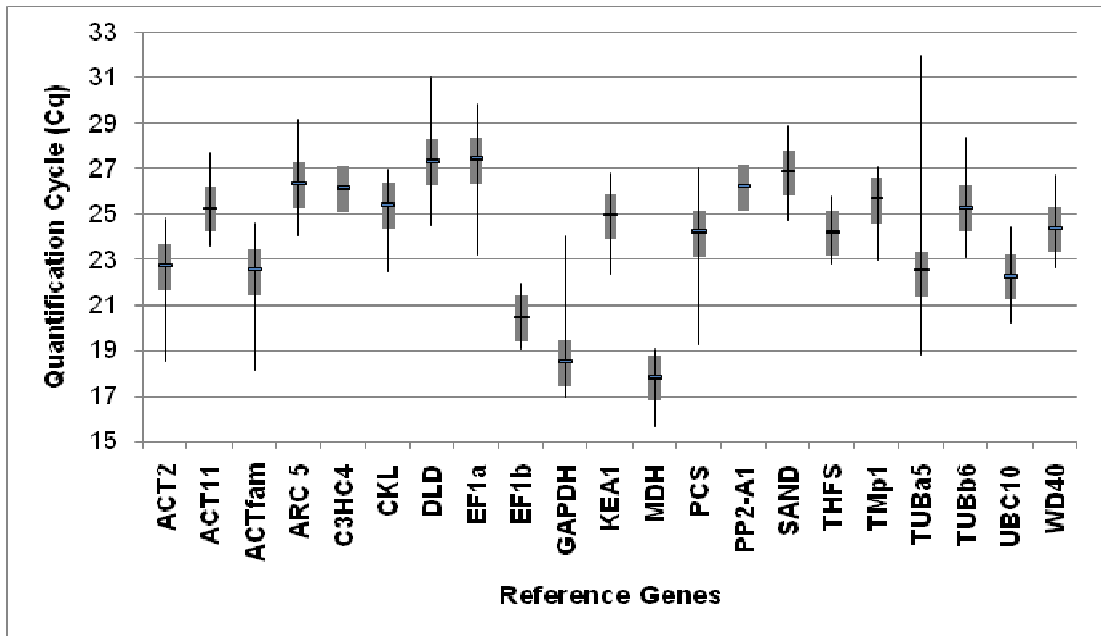
### Expression profiling of candidate reference genes

The quantification cycle (Cq) values were used to analyze steady-state mRNA levels of each gene in ten different apple tissues: dormant buds, bud burst, pink flower buds, young and mature leaves, fruit set, pulp and skin of unripe fruits, and pulp and skin of mature fruits. The 21 evaluated genes showed a relatively wide range of Cq values from the lowest mean Cq (17.65) for *MDH*, to the highest (27.40) for *DLD* in all tested samples. Individual genes presented different expression levels through all samples tested. *EF1 $\beta$*  and *THFS* showed the lowest gene

**Table 1.** Primer sequences and amplicon characteristics of 23 reference gene candidates evaluated by RT-qPCR in *Malus x domestica*.

Acronym	Gene description	Accession code <sup>a</sup>	Forward/Reverse primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Intron size (bp)	Primer efficiency	Amplicon Tm (°C)
ACT2	<i>Actin 2</i>	MDP0000774288	GCCATCCAGGCTGTCTCTC/ TGAGGTCACGACCAGCAAGG	154	78	2.09	86.503
ACT11	<i>Actin 11</i>	MDP0000652692	GCTGTTCTTTCCCTCTACGC/ GCATGGGGAAGAGCATATCC	110	155	1.94	83.236
ACTfam	<i>Actin family</i>	MDP0000572047	ATGTATGTTGCCATCCAGGC/ ACGACCAGCAAGGTCCAGAC	~156	~127	1.89	86.209
		MDP0000774288					
		MDP0000168646					
		MDP0000157737					
ARC5	<i>Accumulation and replication of chloroplast 5</i>	MDP0000138874	CGAGCTGGGTTACGTCAATTTT/ CAGATGCACCACTACCACCTG	76	no	1.99	82.355
		MDP0000254859					
C3HC4	<i>RING C3HC4 zinc finger protein</i>	MDP0000162279	GTGATATGCCTTGAGCAGGAG/ CAACTGGTCAGGTGTAAGGAGC	92	91	2.03	83.123
		MDP0000219802					
CDC48	<i>Cell division cycle protein 48 homolog</i>	MDP0000172461	GCCAATGTACGTGAAATCTTTGAC/ CCCCCAGCATCACCTACACT	116	no	2.90	— <sup>b</sup>
		MDP0000668516					
CKL	<i>Casein kinase 1 isoform delta-like</i>	MDP0000274900	CAAGGACTGAAAGCGGGAAC/ GGATACCCACGGCATAATGC	102	122	2.04	81.101
DLD	<i>Dihydrolipoamide dehydrogenase</i>	MDP0000897124	CCACCTGCATCGAGAAGCGT/ TGGAGAACTTCACTCCGTGA	141	514	1.96	86.808
EF1 $\alpha$	<i>Elongation factor 1 alpha</i>	MDP0000306482	TGCATTCACCTTGGTGTCA/ GGTAGGATGAGACTTCCTTC	116	100	1.92	84.071
EF1 $\beta$	<i>Elongation factor 1 beta</i>	MDP0000903484	AAGGCTTCTACCAAGAAGAAGGA/ TCCTCGAGCTTCTTCATGTC	95	89	1.93	82.138
		MDP0000189047					
		MDP0000626096					
		MDP0000661533					
		MDP0000596986					
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	MDP0000645828	GATGATGTCGTGTCCACCGACTT/ CACTCGTTGTCGTACCATGA	119	93	1.95	84.466
KEA1	<i>K efflux antiporter 1</i>	MDP0000244586	TCTGTGGATTTGGGCGAGTT/ GAGCGTCCAACCTCCACTCT	166	372	2.04	82.924
MDH	<i>Malate dehydrogenase</i>	MDP0000197620	CGTGATTGGGTACTTGGAAC/ TGGCAAGTGACTGGGAATGA	113	88	1.96	84.107
		MDP0000170418					
		MDP0000174740					
PCS	<i>Phytochelatin synthetase-like</i>	MDP0000094767	GGAGATGGACCCAAGCCATG/ AGGAGAGCGAACACACACG	100	2034	1.97	84.454
PP2A-1	<i>Ser/thr-protein phosphatase 2A-1</i>	MDP0000189196	GTTTGGAAAGATCTTTACAGA/ GGAGACAGCCCTCCATGCAA	92	87	1.93	80.356
PP2A-A3	<i>Ser/thr-protein phosphatase 2A-A3</i>	MDP0000290998	TTTGCCCTGAATGGGCAAT/ TGGAGAATCGTCATCCGATA	92	90	1.74	— <sup>b</sup>
		MDP0000088431					
SAND	<i>Protein of unknown function SAND family</i>	MDP0000185470	TACTAATGTGCAACACAAG/ TGATTCTGATGCCATGACAAAGT	85	84	1.96	82.489
		MDP0000202305					
THFS	<i>Formate-tetrahydrofolate ligase</i>	MDP0000182376	AGCAGCGTTGAATACTCAGAG/ ATACTGGGTTTTCGCCATGC	99	380	1.98	83.493
		MDP0000604460					
		MDP0000722369					
TMp1	<i>Type 1 membrane protein-like</i>	MDP0000241680	AGACCGACTCAATGTTGCTCTCA/ GTGGAAGGTGGTGCAAATCC	73	no	2.00	83.251
TUB $\alpha$ 5	<i>Tubulin alpha 5</i>	MDP0000832105	TTTGATGTACAGAGGAGATG/ ATGCCGCACTTGAACCCAGT	117	91	1.98	85.411
		MDP0000681201					
TUB $\beta$ 6	<i>Tubulin beta 6</i>	MDP0000951799	GAATGCAGATGAGTGTATGG/ GACACCAGACATGGTTGCAG	127	211	1.97	83.994
UBC10	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme 10</i>	MDP0000140755	TTGAAGGAGCAGTGGAGTCC/ GCACCAATGGATCATCCGGG	97	267	1.99	83.788
WD40	<i>Transcription factor WD40-like repeat domain</i>	MDP0000168479	GGATTACTGTGTTGGTGAAG/ TGCCAATTACTCTCTTTTCGTG	102	1436	2.01	80.586
		MDP0000230683					

<sup>a</sup> Accession code in "*Malus domestica* genome" database (<http://genomics.research.iasma.it/>)<sup>b</sup> Amplification disregarded because of primer efficiency.



**Figure 1 - The transcriptional profiles of individual candidate reference genes in absolute Ct values over all apple tissue RNA samples. The median is indicated by a line. Each box indicates 25/75 percentiles.**

expression variation (below 3 cycles), while *TUBa5*, *GAPDH* and *PCS* exhibited the highest expression variation (above 7 cycles), as shown in Figure 1. The wide expression range of the 21 genes tested, including traditional housekeeping ones or genes identified as constitutively expressed by microarray data, confirmed that no single gene exhibits a constant expression along all apple tissues or developmental stages evaluated. Therefore, it is necessary to select a set of genes that are suitable to normalize gene expression for each experimental condition.

### GeNorm and NormFinder analyses

Two different statistical descriptors were used to evaluate the candidate reference genes stability, as an effort to minimize intrinsic bias relative to each approach.

*GeNorm* software allows ranking candidate reference genes according to their calculated expression stability (M value) for a sample set, indicating the best pair of them. The results for the 21 tested genes, for different apple tissue samples

**Table 2. Ranking of apple candidate reference genes in order of their expression stability (M) calculated by *geNorm*, and respective pairwise variation values (V).**

All sample set (buds, flowres, leaves and fruits)		Buds, flowers and leaves		Buds (dormant and burst)		Leaves (young and mature)		All fruit tissues (development stades, pulp and skin)		Fruit development (pulp) (imature and mature)		Fruit development (skin) (imature and mature)		Fruit tissue (imature) (pulp and skin)		Fruit tissue (mature) (pulp and skin)	
Ranking	Stability value (M)	Ranking	Stability value (M)	Ranking	Stability value (M)	Ranking	Stability value (M)	Ranking	Stability value (M)	Ranking	Stability value (M)	Ranking	Stability value (M)	Ranking	Stability value (M)	Ranking	Stability value (M)
EF1b and THFS	0.460	C3HC4 and THFS	0.348	EF1b and MDH	0.081	SAND and THFS	0.205	C3HC4 and KEA1	0.326	DLD and TMp1	0.118	ACT2 and CKL	0.198	ARC5 and SAND	0.080	DLD and TMp1	0.139
MDH	0.482	ARC5	0.382	WD40	0.099	ACT11	0.247	SAND	0.495	ACT2	0.173	TMp1	0.242	EF1b	0.122	ACT2	0.207
WD40	0.606	MDH	0.409	ARC5	0.143	PP2A-1	0.260	EF1b	0.540	SAND	0.225	ACTfam	0.274	TUBb6	0.149	ACTfam	0.279
SAND	0.660	KEA1	0.428	C3HC4	0.170	TMp1	0.271	WD40	0.609	CKL	0.254	DLD	0.311	KEA1	0.182	PCS	0.319
C3HC4	0.711	TMp1	0.453	THFS	0.190	ARC5	0.294	THFS	0.650	EF1b	0.271	SAND	0.333	PCS	0.225	CKL	0.371
KEA1	0.741	PCS	0.475	KEA1	0.254	MDH	0.311	MDH	0.692	GAPDH	0.295	EF1a	0.360	GAPDH	0.252	ARC5	0.421
TMp1	0.763	EF1b	0.496	TMp1	0.293	CKL	0.333	TMp1	0.743	THFS	0.326	THFS	0.387	C3HC4	0.272	SAND	0.461
CKL	0.799	CKL	0.517	PCS	0.369	PCS	0.348	CKL	0.786	ACTfam	0.360	EF1b	0.430	EF1a	0.290	KEA1	0.492
PP2A-1	0.838	PP2A-1	0.536	CKL	0.425	ACT2	0.362	ACT11	0.826	EF1a	0.387	C3HC4	0.483	TMp1	0.303	C3HC4	0.509
ARC5	0.882	SAND	0.558	ACTfam	0.470	WD40	0.376	ACTfam	0.875	ACT11	0.428	KEA1	0.527	THFS	0.317	EF1a	0.526
UBC10	0.915	ACTfam	0.580	EF1a	0.502	TUBb6	0.396	ACT2	0.925	KEA1	0.495	UBC10	0.573	CKL	0.330	ACT11	0.551
ACT11	0.939	WD40	0.608	GAPDH	0.533	ACTfam	0.412	EF1a	0.955	C3HC4	0.541	MDH	0.604	DLD	0.352	EF1b	0.582
ACTfam	0.992	ACT2	0.634	SAND	0.554	C3HC4	0.435	PP2A-1	0.983	WD40	0.578	ACT11	0.634	ACT11	0.370	THFS	0.603
EF1a	1.037	ACT11	0.658	PP2A-1	0.580	KEA1	0.450	UBC10	1.011	ARC5	0.614	TUBb6	0.670	ACTfam	0.389	TUBb6	0.640
PCS	1.086	EF1a	0.682	ACT2	0.617	TUBa5	0.468	ARC5	1.039	PP2A-1	0.647	ARC5	0.699	ACT2	0.405	WD40	0.676
ACT2	1.129	TUBb6	0.708	ACT11	0.652	EF1b	0.487	DLD	1.076	MDH	0.682	WD40	0.732	MDH	0.426	UBC10	0.716
DLD	1.166	UBC10	0.741	UBC10	0.705	GAPDH	0.505	PCS	1.137	UBC10	0.717	GAPDH	0.778	UBC10	0.446	GAPDH	0.761
TUBb6	1.203	GAPDH	0.774	TUBb6	0.749	UBC10	0.550	TUBb6	1.191	TUBb6	0.765	PP2A-1	0.829	WD40	0.477	PP2A-1	0.811
GAPDH	1.250	DLD	0.839	DLD	0.816	EF1a	0.589	GAPDH	1.257	PCS	0.836	PCS	0.941	PP2A-1	0.506	MDH	0.860
TUBa5	1.543	TUBa5	0.962	TUBa5	1.046	DLD	0.621	TUBa5	1.574	TUBa5	1.080	TUBa5	1.172	TUBa5	0.692	TUBa5	0.948
V2/3	0.146	V2/3	0.121	V2/3	0.034	V2/3	0.083	V2/3	0.185	V2/3	0.064	V2/3	0.083	V2/3	0.048	V2/3	0.077
								V3/4	0.132								

Note: pairwise variation values (V) are presented only to reach the cut-off 0.15, below which it is not necessary the addition of one more gene as reference to a reliable normalization.  $V2/3 < 0.15$  means that the two most stable genes are sufficient to normalization purpose in each sample set.

are summarized in Table 2. The two most stable control genes in each sample group could not be ranked in a preferential order because of the required use of gene ratios for stability measurements [41]. Pairwise variation ( $V$ ) was calculated to obtain the optimal number of normalization factors, and those values are also presented in Table 2, only to reach the cut-off value 0.15.

*GeNorm* program recommends using an  $M$  value below the threshold of 1.5 to identify genes with stable expression, but some authors have proposed the maximum value of 0.5 for more accurate results [42]. According to this second recommendation, at least three stable genes, with the lowest  $M$  values, are suitable to normalize expression values if we consider all combinations of samples of interest or focus of our research. Nevertheless, we found that the top-ranked gene pair is sufficient for normalization purposes in each sample set (Table 2,  $V_{2/3} < 0.15$ ), except for the combination of fruit tissues, where it is suggested the use of three reference genes (Table 2,  $V_{3/4} < 0.15$ ).

*NormFinder* software uses a mathematical model that enables the estimation of gene expression based not only on the overall variation of normalization genes but also on the variation among subgroups of sample sets [43]. The results concerning our candidate genes after processing data by *NormFinder* for apple expression studies are shown in Table 3. Considering that the best genes are those with the lowest stability value according to *NormFinder*, with minimal intra- and intergroup variation, these are ranked at the top in Table 3. In addition, *NormFinder* allowed us to indicate the best combination of gene pairs to normalize subgroups within each sample set (Table 3).

Taking all results together, the first important observation is that the five best control genes identified by *geNorm* and *NormFinder* are the same: *EF1 $\beta$* , *MDH*, *SAND*, *THFS* and *WD40*. These five genes are pointed by both softwares when all samples are considered for an apple expression study, including different developmental stages or tissues of buds, flowers, leaves and fruits, without subgroups. This is a robust result that increases the reliability of our data and experimental design, since, even based on distinct statistic algorithms, for these reference genes there were no discrepancies between software outputs.

When only dormant and burst buds were analyzed, *EF1 $\beta$* , *MDH* and *WD40* were coincident in both approaches as having stability values close to zero, although, by *NormFinder*, the pair *KEA1* and *TMP1* would be the best combination for

normalization. For expression investigation on young and mature leaves, the *ACT11*, *Tmp1* and THFS are, according to both softwares, the best and sufficient combination of reference genes for a proper normalization of data.

**Table 3. Ranking of apple candidate reference genes in order of their expression stability calculated by NormFinder.**

Ranking	All sample set											
	(non-subgroups)			(buds, flowers, leaves x fruits)			Buds			Leaves		
	Stability value	Ranking	Best	Stability value	Ranking	Best	Stability value	Ranking	Best	Stability value	Ranking	Best
SAND	0.076	SAND	0.038	TMp1	0.013	ACT11	0.032	EF1b	0.041	EF1b	0.052	EF1b
EF1b	0.099	THFS	0.050	KEA1	0.071	TMp1	0.073	SAND	0.063	SAND	0.069	SAND
THFS	0.111	PP2-A1	0.052	MDH	0.132	ACT2	0.089	THFS	0.141	THFS	0.085	THFS
MDH	0.127	WD40	0.057	EF1b	0.146	CKL	0.115	CKL	0.156	CKL	0.092	CKL
WD40	0.136	PCS	0.062	WD40	0.156	MDH	0.125	ACT11	0.160	TMp1	0.094	UBC10
CKL	0.144	MDH	0.063	ARC5	0.175	PCS	0.125	WD40	0.162	DLD	0.103	WD40
TMp1	0.148	EF1b	0.071	PCS	0.179	THFS	0.144	ARC5	0.172	ACTfam	0.122	PP2-A1
ARC5	0.152	UBC10	0.087	C3HC4	0.189	ACTfam	0.146	MDH	0.174	MDH	0.125	ARC5
PCS	0.156	GAPDH	0.089	THFS	0.191	SAND	0.157	TMp1	0.174	EF1a	0.127	ACT11
PP2-A1	0.157	C3HC4	0.092	CKL	0.203	PP2-A1	0.160	ACTfam	0.191	UBC10	0.131	KEA1
ACTfam	0.159	KEA1	0.093	EF1a	0.222	TUBa5	0.172	UBC10	0.197	WD40	0.132	PCS
EF1a	0.160	EF1a	0.099	UBC10	0.233	ARC5	0.173	DLD	0.197	PP2-A1	0.134	TUBb6
UBC10	0.163	ACTfam	0.102	ACTfam	0.259	TUBb6	0.186	EF1a	0.197	ACT2	0.139	EF1a
KEA1	0.170	ARC5	0.105	ACT2	0.272	C3HC4	0.207	PCS	0.209	ARC5	0.140	ACTfam
DLD	0.172	DLD	0.106	ACT11	0.281	KEA1	0.207	PP2-A1	0.211	ACT11	0.160	DLD
C3HC4	0.173	TMp1	0.107	SAND	0.288	WD40	0.215	ACT2	0.226	TUBb6	0.184	TMp1
ACT2	0.184	CKL	0.112	GAPDH	0.294	EF1b	0.234	KEA1	0.228	TUBa5	0.193	MDH
ACT11	0.229	ACT2	0.118	TUBa5	0.298	GAPDH	0.253	C3HC4	0.234	GAPDH	0.208	C3HC4
GAPDH	0.242	TUBb6	0.135	TUBb6	0.313	DLD	0.285	GAPDH	0.302	PCS	0.218	GAPDH
TUBb6	0.300	ACT11	0.138	PP2-A1	0.321	UBC10	0.295	TUBb6	0.338	C3HC4	0.229	ACT2
TUBa5	0.335	TUBa5	0.200	DLD	0.411	EF1a	0.315	TUBa5	0.463	KEA1	0.245	TUBa5
Best combination	Stability value	Best	Stability value	Best	Stability value	Best	Stability value	Best	Stability value	Best	Stability value	Best
— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	SAND and THFS	0.025	KEA1 and TMp1	0.038	ACT2 and ACT11	0.040	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	SAND and THFS	0.036	CKL and SAND

<sup>a</sup> NormFinder software does not calculate that combination.



As *NormFinder* accepts the definition of subgroups, some sample sets were a little different from those established by *geNorm*, especially when fruits were investigated. This was mainly due because the same fruit sample included different developmental stages and tissues. Considering all fruit samples, among the top ranking genes for the two strategies of analysis, it was possible to find *EF1 $\beta$* , *SAND*, *THFS* and *WD40* as the best reference genes.

When the goal was the comparison of unripe and mature fruits, regardless of the tissue evaluated, two *geNorm* analyses were performed. In both, *ACT2*, *CKL*, *DLD*, *Tmp1* and *SAND* presented quite stable expression. According to *NormFinder*, the top five more stable genes included *EF1 $\beta$* , *CKL*, *SAND*, *THFS* and *Tmp1*. Therefore, taking in account both results, we assumed the combination of the three recurrent genes, *CKL*, *SAND* and *Tmp1*, as the best option for normalization in the gene expression analysis when studying apple fruit development.

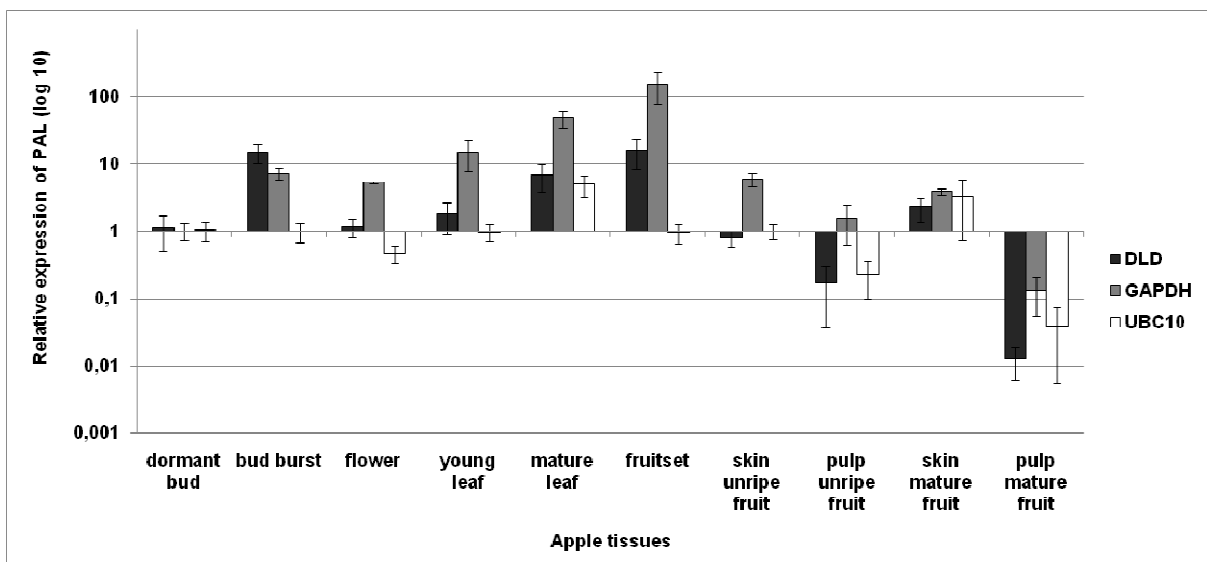
*ARC5* and *SAND* were top ranked genes according to the *geNorm* analysis for immature fruits, but not for mature ones. In that case, however, their stability value (M) was below 0.5, which meant that they could still be trusted as good normalizers [42]. Considering the *NormFinder* analysis, *EF1 $\beta$*  and *SAND* were the top ranked genes. Thus, to evaluate the differences between fruit pulp and skin, regardless of fruit developmental stage, *ARC5*, *EF1 $\beta$*  and *SAND* seemed to be the most stable genes.

## Reference gene validation

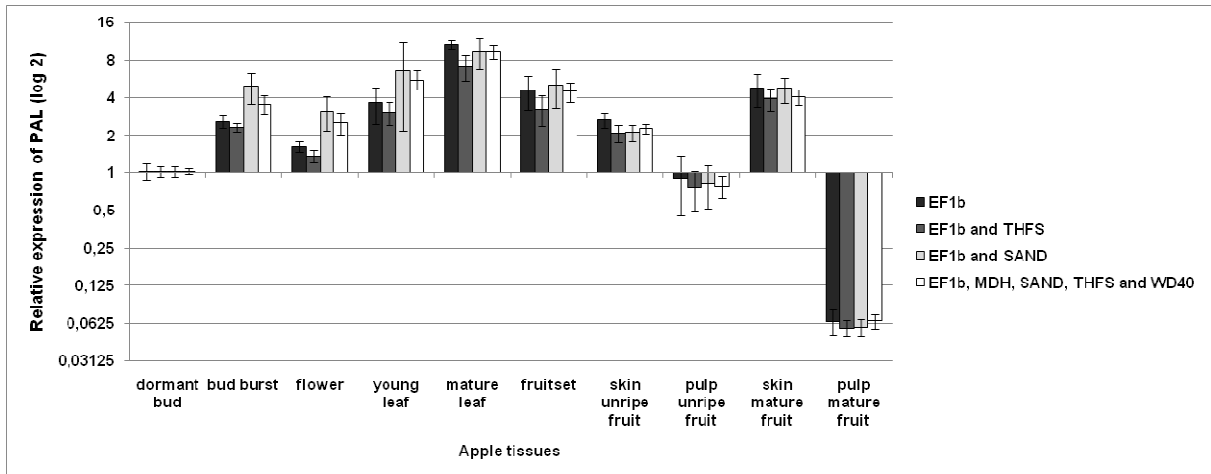
The expression of apple phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) was analyzed by RT-qPCR to demonstrate the validity of using the best candidate genes as internal normalizers. In apple gene expression database *Dana Farber Cancer Institute and Harvard School of Public Health* (DFCI; <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>), ESTs correspondent to *PAL* gene (accession code TC60080) are described for 23 apple tissue or organ libraries. *PAL* ESTs are presented in about 0,06% from buds ESTs library total, 0,08% from leaves libraries and 0,10% from fruit ones. *PAL* steady-state mRNA levels measured by RT-qPCR were normalized using four different strategies: (1) with all candidate reference genes individually; (2) with the two most stable reference genes selected by *NormFinder*; (3) with the two most stable reference

genes identified by *geNorm*; (4) with the five most stable reference genes suggested by both analyses. Dormant buds were considered as the reference sample.

When a single gene was used as reference for normalizing *PAL* relative expression, a clear large fluctuation of results occurred. As shown in Figure 2, the variation of *PAL* mRNA levels using *DLD*, *GAPDH* or *UBC10* as reference genes individually lead to a wide variation in relative expression of the test gene. Results of *PAL* relative expression normalized by all candidate reference genes are presented in Additional file 3. Since we are dealing with relative expression values, it is understandable that *PAL* mRNA levels would vary according to the reference gene employed for normalization. However, good reference genes should show a similar trend in the relative expression of the target gene when studying distinct sampling conditions. This was not the case for *DLD*, *GAPDH* and *UBC10*, because *PAL* expression profile in the ten apple tissues tested was not the same as indicated for each one. For instance, while *PAL* exhibited an increased expression of about ten-fold in sprouting buds in comparison to dormant buds, considering *DLD* or *GAPDH* as references, such conclusion was not equivalent when *UBC10* gene was employed as reference. Similar condition was observed in fruitset tissue. In flowers, whether



**Figure 2 - Relative expression levels of phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) in different apple tissues, normalized by three reference genes individually, *DLD*, *GAPDH* or *UBC10*. Standard error bars are indicated.**



**Figure 3 - Relative expression levels of phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) in different apple tissues, normalized by different combinations of reference genes, as indicated. *EF1b* and *THFS* were the two most stable reference genes selected by *geNorm*, while *EF1b* and *SAND* were indicated by *NormFinder*. The five most stable reference genes suggested by both analyses. Standard error bars are indicated.**

really there was a decreased expression of *PAL*, it did not occur in the same proportion considering the three reference genes employed. In unripe fruits, *GAPDH* showed inconsistent *PAL* relative expression compared to the other two reference genes. None of these three genes, *DLD*, *GAPDH* and *UBC10*, was considered a good normalizer by either *geNorm* or *NormFinder* analyses for apple expression studies.

When the best combinations of reference genes were evaluated for the normalization of *PAL* relative expression in all apple samples tested, an expression profile of *PAL* much more reliable was obtained, as shown in Figure 3 and in Additional file 3. *PAL* steady-state mRNA levels relative to the *EF1 $\beta$*  expression are shown for comparison. Since *EF1 $\beta$*  was considered one of the most stable genes by both *geNorm* and *NormFinder*, *PAL* expression in relation to it was consistent with that obtained with the employment of the two best reference genes indicated by each software. Also, *PAL* expression profiles normalized against each gene pair was equivalent to that supplied by using the five best reference genes according to the rankings of both *geNorm* and *NormFinder* for the evaluation of gene expression in all apple tissues.

## DISCUSSION

RT-qPCR is considered today the gold standard for accurate, sensitive and fast measurement of gene expression [44]. However, the use of appropriate, robust validation in all measurements of steady-state mRNA levels with trustable reference genes is very important and advisable [45]. Traditional housekeeping genes have been proved to lack real constitutive expression over all tested sample conditions and, additionally, reference genes validated for certain studies are not applicable to other species or experimental conditions [20, 26, 32, 36].

To select the best genes to be used as references for gene expression studies by RT-qPCR in apple trees, we searched for commonly used housekeeping genes and also for potential normalizer genes whose pattern of stable expression was deduced from microarray data. The strategy of using data from expression libraries as source to identify candidate reference genes is a very interesting one and has already been applied to some plant species. The use of tomato (*Lycopersicon esculentum*) expressed sequence tag (EST) libraries was one of the first reported with this purpose [46]. The exceptionally large set of data from microarrays also provides opportunity to identify new reference genes, as it has been taken as an application perspective for such assays [47]. Such approach has also been done for the model plant species *Arabidopsis thaliana* (Czechowski et al., 2005), *Eucalyptus grandis* [48] and wheat [49]. When looking for best reference genes for gene expression studies in apple we used available data from two previous studies. Pichler and colleagues [14] carried out a microarray analysis of the variability of gene expression in summer and autumn buds from field-grown apple trees. Jensen and collaborators [16] carried out an analysis of gene expression pattern in summer shoot tip 'Gala' scions grafted to seven different rootstocks, grown in greenhouse. From these two works, genes with an average expression level and the lowest standard deviation were selected as candidate normalizers.

The 23 candidate reference genes chosen represent distinct cellular functional classes: cytoskeleton (*ACT2*, *ACT11*, *ACTfam*, *TUB $\alpha$ 5*, *TUB $\beta$ 6*), transport of vesicles (*CKL*) or ions (*KEA1*), transport in vacuoles (*SAND*) or membranes (*TMp1*), glucose metabolism (*GAPDH* and *MDH*), protein metabolism (*DLD*, *EF1 $\alpha$* , *EF1 $\beta$*  and *UBC10*) or that of nucleic acids (*THFS* and *WD40*), cell signaling (*C3HC4*,

*PP2-A1* and *PP2A-A3*), cell division (*CDC48*) or division of organelles (*ARC5*), and metal detoxification (*PCS*). We decided to not evaluate the expression of ribosomal RNAs, such as *18S rRNA*, because of their high transcriptional level, unlike most genes of interest. So, the use of them as reference could add deviations in relative quantifications of target, test genes. Furthermore, genes encoding rRNAs can only be used as references when the approach of the work is based on total RNA samples; when purified mRNA is the source of templates for PCR, an rRNA cannot be used.

Input RNA material for RT-qPCR must be pure, integrate and free of contaminating DNA [44]. The RNA extraction protocol used in the present study, adapted from Reid *et al.* [25] adapted from Zeng and Yang [50], for volume scale of microcentrifuge tubes, was successfully performed for all samples, assuring high quality and integrity to purified nucleic acids. Apart from these, although the majority of primer pairs had been designed to flank a deduced intron, we considered to include a DNase treatment step, to ensure that the total RNA sample was free of DNA. In this work, were evaluated 30 representative samples of 10 different apple tissues or organ development stages: dormant and open buds, flowers, young and expanded leaves, fruitset, skin and pulp of unripe and mature fruits. Thus, vegetative and reproductive tissues of a commercial cultivar were investigated, from field-grown plants. As the objective was also to evaluate expression stability of each candidate reference gene in different samples, it was given preference to a sample maximization system, rather than gene maximization, i.e. all samples were analyzed in the same run, and genes were spread across runs.

Primer analyses, besides considering alignment of sequences with BLAST tools, were performed *in silico* also to verify secondary structures, for each oligonucleotide or for its correspondent pair and potential self or heterodimer. In RT-qPCR experiments, primers were empirically validated by standard curves, in order to estimate their efficiency, and by melt curves to evaluate its specificity. As suggested by Derveaux and colleagues [44], we used an equivalent mixture of representative samples as input material for the dilution series, which allowed us to preserve our samples and, at the same time, generate reliable estimates of PCR efficiency. Indeed, only two gene primers were not satisfactory in efficiency evaluation, *CDC48* and *PP2A-A3*, and were therefore discarded.

In order to define the expression stability of apple candidate reference genes in the context of our sample conditions, we used two of the most employed algorithms for such purpose, *geNorm* [41] and *NormFinder* [43]. Comparing different statistical approaches to select normalizing genes allowed a better assessment of the most reliable references, decreased the risk of selection of co-regulated genes and also excluded one gene fostering over another because of tendency of some algorithm. The most prominent observation after completing the two analyses was that both statistical algorithms produced similar gene ranking, for all samples or subgroups tested. It enabled us to indicate *EF1 $\beta$* , *MDH*, *SAND*, *THFS* and *WD40* as the most reliable reference genes when all apple samples were considered, and to affirm that specific two or three genes combinations are the ideal ones and sufficient to normalize test gene expression when determined tissues or developmental apple stages are studied. Note, however, that *THFS* and *WD40* belong to the same functional class; then, they should not be used together.

An interesting point worth to mention is that, for every apple sample set considered, at least one traditional housekeeping gene and one new reference gene were recognized as the most stable ones. Such observation reinforces our assumption about the potential use of expression data derived from microarray or EST libraries as sources of information to out promising candidate reference genes. In addition, recently, the first investigation concerning the suitability of microRNAs (miRNAs) as internal control transcripts in plants was presented [30]. Then, approaches like this might also provide adequate controls for normalization of gene expression data.

According to our observations and those of many other authors, there is not a single universal reference gene for all experimental conditions or plant species under evaluation at the level of gene expression [20, 26, 32, 36, 41, 51], but for related species some similarities are found. Expression analyses of candidate reference genes in two Solanaceae species, potato [24] and tobacco [39], for instance, revealed that *EF1 $\alpha$*  was a suitable reference gene, while genes encoding actin or tubulin were the worst ones. When expression studies from rice [26] and wheat [49] are compared, *EF1 $\alpha$*  is again present among the most stable genes, and *GAPDH* has been described as one of the worst reference genes for these Poaceae species. However, *18S* and *25S rRNAs* are stable in rice but not in wheat. Our results may be compared to those obtained in peach RT-qPCR studies [36], a fruit species also

belonging to the Rosaceae family. *GAPDH* transcripts exhibited poor stability both in peach [36] and apple (Tables 2 and 3), and a translation elongation factor showed higher stability ([36]; Tables 2 and 3). Other conclusions cannot be done because of differences between experimental conditions and the total group of candidate genes evaluated.

Finally, we emphasize that putative reference genes need to be investigated and validated, for each sample data. Specific normalizers make the data reliable, in any technology, including RT-qPCR, and avoid statistical significance undue or incorrect conclusions and characterizations, as exemplified here by *PAL* gene relative expression.

## CONCLUSIONS

Traditional housekeeping genes or genes suggested to be constitutive by microarray data were evaluated as potential reference genes for gene expression studies in vegetative and reproductive tissues of the apple 'Gala' cultivar. Based on the results here presented, *EF1 $\beta$* , *MDH*, *SAND*, *THFS* and *WD40* were found to be the most stable and suitable normalizers for all apple tissue expression analyses by RT-qPCR. Specific combinations of two or three control genes were shown to be sufficient to normalize each apple sample set analyzed.

## METHODS

### Plant material

Plant material was obtained from clones of Gala Baigent<sup>®</sup> apple trees, with three years, grafted on rootstock Maruba with M9 filter, grown in an experimental orchard at the Temperate Fruit Experimental Station of Embrapa Uva e Vinho, in Vacaria/RS, Brazil (28°30'50" S, 50°54'41" W). Ten different tissues were collected through vegetative and reproductive 2009/2010 cycle: dormant buds (development stage A for pome fruits, according to Felckinger Scale, presented in [52]), bud burst (C stage), flower buds like pink buds stage (E2 stage), young leaves (E2 stage), mature leaves (I stage), fruit set, whole, with 10 mm in diameter (I stage), pulp and skin of unripe fruits, with 40 mm in diameter (J stage), and pulp and skin of mature fruits, with ~70 mm in diameter. Pictures that represent these stages considered for the study are in Additional file 1. Samples, considering three biological parcels containing 10 plants each, were frozen in liquid N<sub>2</sub> in the field and stored at -80 °C until RNA extraction.

### RNA isolation and quality controls

Total RNA was isolated as described by Reid and colleagues [25], a protocol previously developed by Zeng and Yang [50], without a commercial kit. For each sample, three to eight extractions were conducted in parallel in microcentrifuge tubes, from 10 mg of powdered plant material and 750 µL extraction buffer. After nucleic acids precipitation with sodium acetate and isopropanol, pellets of each sample were dissolved in water and placed in a single tube to a final volume of 500 µL. Following selective precipitation of RNA with 2 M lithium chloride and washing, RNA pellet was dissolved in 50-200 µL TE prepared with RNase-free reagents. Only RNA samples with 260/280 ratio between 1.8 and 2.0 and 260/230 ratio greater than 2.0 were used for subsequent analysis. RNA concentration also was evaluated by spectrophotometer (*GeneQuant pro*, Amersham Biosciences). The integrity of the RNA samples was also assessed on 0,85% agarose gel electrophoresis and



ethidium bromide staining. Before storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ , 1-2  $\mu\text{L}$  of RNase inhibitor (*RNaseOUT*, Invitrogen) was added to the samples.

### Reverse transcription

Ten micrograms of total RNA in up to 18,6  $\mu\text{L}$  were treated with 4 units of *TURBO DNase* (Applied Biosystems) in 24  $\mu\text{L}$  reaction. EDTA was added to a final concentration of 15 mM to preserve RNA before enzyme heat inactivation. cDNAs were synthesized from 1  $\mu\text{g}$  of RNA using *GeneAmp RNA PCR Core Kit* (Applied Biosystems), including its oligo(dT)<sub>16</sub>, following the manufacturer's instructions. All samples were validated by a PCR amplification with a intron flanking primer pair using genomic DNA and cDNA samples.

### Candidate genes selection

A first set of normalizer candidate genes for expression studies in *Malus x domestica* was searched as orthologs of commonly used housekeeping genes for different plant species [20, 22-26, 29, 36, 38]. The selected genes were: *ACT2* (actin 2), *ACT11* (actin 11), *ACTfam* (actin family), *EF1 $\alpha$*  (elongation factor 1 alpha), *EF1 $\beta$*  (elongation factor 1beta), *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), *MDH* (malate dehydrogenase), *PP2A-1* (serine/threonine-protein phosphatase 2A-1), *PP2A-A3* (serine/threonine-protein phosphatase 2A subunit A3), *SAND* (protein of unknown function SAND family), *TUB $\alpha$ 5* (tubulin alpha 5), *TUB $\beta$ 6* (tubulin beta 6) and *UBC10* (ubiquitin-conjugating enzyme 10). A second set was based on two works that provided apple microarray data [14, 16], from which were identified genes with a medium expression level and the lowest standard deviation. These genes were: *ARC5* (accumulation and replication of chloroplast 5), *C3HC4* (ring C3HC4 zinc finger protein), *CDC48* (cell division cycle protein 48 homolog), *CKL* (casein kinase 1 isoform delta-like), *DLD* (dihydrolipoamide dehydrogenase), *KEA1* (K<sup>+</sup> efflux antiporter 1), *PCS* (phytochelatin synthetase-like protein), *THFS* (formate-tetrahydrofolate ligase), *TMp1* (type 1 membrane protein-like) and *WD40* (transcription factor WD40-like repeat domain).

All 23 candidate genes representing distinct functional classes were identified by BLAST searches in the public apple EST database (*DFCI Apple Gene Index*, <http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=apple>, and *TIGR Plant Transcript Assemblies*, [http://blast.jcvi.org/euk-blast/plantta\\_blast.cgi](http://blast.jcvi.org/euk-blast/plantta_blast.cgi)), and the genomic sequence, to considered proximity of introns sequences, was accessed by searching the apple genome (*The Malus Domestica Genome*, <http://genomics.research.iasma.it/>), or compared with *Arabidopsis thaliana* genome (*The Arabidopsis Information Resource*, <http://www.arabidopsis.org/>).

### Primer design and efficiency

Primers were designed using *Primer3 v.0.4.0* software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) and tested using *OligoAnalyzer IDT* software (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>). Primer pairs for *ARC5* and *Tmp1* were taken from literature [16]. The accession numbers, gene description, primers sequences, amplicon lengths and whether intron spanning are shown in Table 1. All primer pairs produced a single product, inspected in the melt curve on RT-qPCR experiments (Additional file 2), and their melting temperature ( $T_m$ ) are also showed in Table 1. Exceptions for *EF1 $\alpha$* , *EF1 $\beta$*  and *TUB $\beta$ 6*, where there is a different amplification product when the cDNA-target is not present; likely, to be dimer of primers.

In order to evaluate primer efficiency, a standard curve was constructed, with five points in a fivefold sample dilution series. Primer efficiency (E) and correlation coefficient ( $R^2$ ) were calculated using *StepOne Software v.2.1* (Applied Biosystems). PCR amplification efficiencies were calculated for each candidate endogenous control with the formula  $E=10^{-1/\text{slope}}$ , using the slope of the plot, Ct versus log input of cDNA. It was used a equivalent mixture of the representative samples as input material for the dilution series, as recommended by Derveaux *et al.* [44]. The estimated primer efficiencies are presented in Table 1. Primers were synthesized by IDT-Integrated DNA Technologies.

### Quantitative PCR

Polymerase chain reactions were performed in a *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). SYBR Green (1:10000 dilution) was used to monitor dsDNA synthesis, and ROX (1X) was employed as passive fluorescence reference. Reactions were done in 20  $\mu$ L volumes containing 10  $\mu$ L diluted cDNA (1:100), 200 nM of each primer, 50  $\mu$ M of each dNTP, 0.2 units of AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems), 1X Buffer Solution (Applied Biosystems) and 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems). Each biological sample was analyzed in technical triplicates and no-template controls were included. RT-qPCR assays were conducted with following cycling: 95 °C for 10 min to enzyme activation, 40 amplification cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min, and finally dissociation curve between 60 °C and 95 °C.

## Data analyses

The number of cycles needed for the amplification-associated fluorescence to reach a specific threshold level of detection (the Ct value, or quantification cycle, the Cq) is inversely correlated to the amount of nucleic acid that was in the original sample [53]. For analyses, the Ct values were converted to quantities via the comparative Ct method, where each sample Cq is subtracted from the lowest Cq ( $\Delta$ Cq), and, then,  $Q = E^{\Delta Cq}$ , E being efficiency. PCR amplification efficiencies were calculated on *StepOneSoftware v2.1* (Applied Biosystems) for each candidate endogenous control with the formula  $E = 10^{-1/\text{slope}}$ , using the slope of the plot Ct versus log input of cDNA. The stability of each candidate gene expression across samples was analyzed using *geNorm* version 3.5 [41] and *NormFinder* [43] softwares. *NormFinder* only ranks candidate genes by their stability (minor value corresponds to a more stable expression) and suggests the two best normalizers for different group comparisons. *GeNorm* algorithm also determines the optimal number of genes required for normalization, by calculating the pairwise variation (V), which measures the effect of adding further reference genes on the normalization factor (NF), for example,  $V_{n/n+1}$  between the  $NF_n$  (including the  $n$  most stable reference genes) and the normalization factor  $NF_{n+1}$  (including the  $n+1$  most stable reference genes). Vandesompele *et al.* [41] suggest 0.15 as V value cut-off, below which the

inclusion of an additional reference gene is not required. In other words, when  $V_{n/n+1} < 0.15$ , it is sufficient to use  $n$  genes as reference for a given sample, because of the high correlation coefficient between  $NF_n$  and  $NF_{n+1}$ .

### Reference gene validation

To demonstrate how the use of different reference genes can affect the normalization of the expression data for a gene of interest, it was calculated the mean expression of a target gene between different tissue samples. *PAL* (phenylalanine ammonia-lyase) expression was evaluated by RT-qPCR by following primer pair, designed as described above: GGCATTTGGAGGAGAACTTG (forward primer sequence 5'-3') and AGAACCTTGAGGGGTGAAGC (reverse primer sequence 5'-3'), which amplify, with an efficiency of 2.02, three genes from *Malus x domestica* genome: MDP0000261492, MDP0000191304, MDP0000388769 (accession code in <http://genomics.research.iasma.it/>), producing a 108 bp amplicon, which  $T_m$  is 83.81 °C, flanking an estimated 81 bp intron. The expressions of the target gene *PAL* were normalized using four different strategies: (1) with all candidate reference genes individually; (2) with the two most stable reference genes selected by *NormFinder*; (3) with the two most stable reference genes identified by *geNorm*; (4) with the five most stable reference genes suggested by both analyses. To calculate the relative expression of the target gene, it was used the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [54]. Were utilized the three biological samples as described in plant material section. When two or more genes were employed for normalization, it was obtained, for each sample tissue, the average of *PAL* relative expression values by each individual reference gene, and calculated the standard error.

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

PP performed all experimental procedures, RT-qPCR data analyses and drafting of the manuscript. LFR, PRDO and PP were responsible for samplings. GP, MMP and LFR were study designers, supervisors, and final reviewers of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Vanessa Buffon for technical assistance. PP received a fellowship from the Ministry of Education agency “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES), Brazil. This work was supported by the “Financiadora de Estudos e Projetos” (FINEP) and “Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária” (EMBRAPA), Brazil.

## REFERENCES

1. Potter D, Eriksson T, Evans RC, et al. **Phylogeny and classification of Rosaceae**. *Plant Systematics and Evolution* 2007, **266**:5-43.
2. Kellerhals M: **Introduction to Apple (*Malus x domestica*)**. In *Plant Genetics and Genomics. Vol 6: Genetics and Genomics of Rosaceae* . edited by Folta KM, Gardiner SE New York: Springer; 2009:636.
3. **Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAOSTAT** [<http://faostat.fao.org/>].
4. Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, et al. **The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.)**. *Nature Genetics* 2010, **42**:833-839.
5. Maric S, Lukic M, Cerovic R, Mitrovic M, Boskovic R: **Application of molecular markers in apple breeding**. *Genetika* 2010, **42**:359-375.
6. Milčevićová R, Gosch C, Halbwirth H, et al. **Erwinia amylovora-induced defense mechanisms of two apple species that differ in susceptibility to fire blight**. *Plant Science* 2010, **179**:60-67.
7. Kosina J: **Effect of dwarfing and semi dwarfing apple rootstocks on growth and productivity of selected apple cultivars**. *Horticultural Science* 2010, **37**:121-126.
8. Heide OM, Prestrud AK: **Low temperature, but not photoperiod, controls growth cessation and dormancy induction and release in apple and pear**. *Tree Physiology* 2005, **25**:109-114.
9. Garcia-Bañuelos ML, Gardea AA, Winzerling JJ, Vazquez-Moreno L: **Characterization of a Midwinter-Expressed Dehydrin (DHN) Gene from Apple Trees (*Malus domestica*)**. *Plant Molecular Biology Reporter* 2009, **27**:476-487.

10. Wei J, Ma F, Shi S, et al. **Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit.** *Postharvest Biology and Technology* 2010, **56**:147-154.
11. Łata B, Trampczynska A, Paczesna J: **Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition.** *Scientia Horticulturae* 2009, **121**:176-181.
12. EHA: **Analyses of expressed sequence tags from apple.** *Plant Physiology* 2006, **141**:147-166.
13. Wisniewski M, Bassett C, Norelli J, et al. **Expressed sequence tag analysis of the response of apple (*Malus x domestica*'Royal Gala') to low temperature and water deficit.** *Physiologia plantarum* 2008, **133**:298-317.
14. Pichler FB, Walton EF, Davy M, et al. **Relative developmental, environmental, and tree-to-tree variability in buds from field-grown apple trees.** *Tree Genetics & Genomes* 2007, **3**:329-339.
15. Soglio V, Costa F, Molthoff JW, et al. **Transcription analysis of apple fruit development using cDNA microarrays.** *Tree Genetics & Genomes* 2009, **5**:685-698.
16. Jensen PJ, Makalowska I, Altman N, et al. **Rootstock-regulated gene expression patterns in apple tree scions.** *Tree Genetics & Genomes* 2009, **6**:57-72.
17. Bustin SA: **Why the need for qPCR publication guidelines?--The case for MIQE.** *Methods* 2010, **50**:217-226.
18. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. **The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.** *Clinical Chemistry* 2009, **55**:611-622.
19. Radonic A, Thulke S, Mackay IM, et al. **Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, **313**:856-862.

20. Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH: **Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies.** *BMC Plant Biology* 2004, **4**:14-20.
21. Iskandar HM, Simpson RS, Casu RE, et al. **Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane.** *Plant Molecular Biology Reporter* 2004, **22**:325-337.
22. Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK: **Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization.** *Plant Physiology* 2005, **139**:5-17.
23. Remans T, Smeets K, Opdenakker K, et al. **Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations.** *Planta* 2008, **227**:1343-1349.
24. Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D: **Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress.** *Journal of Experimental Botany* 2005, **56**:2907-2914.
25. Reid K, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund S: **An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development.** *BMC Plant Biology* 2006, **6**:27-37.
26. Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP: **Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006, **345**:646-651.
27. Tu L, Zhang X, Liu D, et al. **Suitable internal control genes for qRT-PCR normalization in cotton fiber development and somatic embryogenesis.** *Chinese Science Bulletin* 2007, **52**:3110-3117.
28. Artico S, Nardeli SM, Brilhante O, Grossi-de-Sa MF, Alves-Ferreira M: **Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data.** *BMC Plant Biology* 2010, **10**:49-60.



29. Jian B, Liu B, Bi Y, et al. **Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR.** *BMC Molecular Biology* 2008, **9**:59-72.
30. Kulcheski FR, Marcelino FC, Nepomuceno AL, Abdelnoor RV, Margis R: **The use of microRNAs as reference genes for quantitative polymerase chain reaction in soybean.** *Analytical Biochemistry* 2010, **406**:185-192.
31. Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A, Pérez JA: **Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process.** *BMC Plant Biology* 2008, **8**:131-142.
32. Løvdaal T, Lillo C: **Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress.** *Analytical Biochemistry* 2009, **387**:238-242.
33. Hong S-Y, Seo PJ, Yang M-S, Xiang F, Park C-M: **Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR.** *BMC plant biology* 2008, **8**:112-122.
34. Martin RC, Hollenbeck VG, Dombrowski JE: **Evaluation of Reference Genes for Quantitative RT-PCR in *Lolium perenne*.** *Crop Science* 2008, **48**:1881-1887.
35. Barsalobres-Cavallari CF, Severino FE, Maluf MP, Maia IG: **Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions.** *BMC Molecular Biology* 2009, **10**:1.
36. Tong Z, Gao Z, Wang F, Zhou J, Zhang Z: **Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR.** *BMC Molecular Biology* 2009, **10**:71-83.
37. Wan H, Zhao Z, Qian C, et al. **Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber.** *Analytical Biochemistry* 2010, **399**:257-261.
38. Lin YL, Lai ZX: **Reference gene selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree.** *Plant Science* 2010, **178**:359-365.

39. Schmidt GW, Delaney SK: **Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress.** *Molecular Genetics and Genomics* 2010, **283**:233-41.
40. Almeida MR de, Ruedell CM, Ricachenevsky FK, et al. **Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during in vitro adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill.** *BMC Molecular Biology* 2010, **11**:73-84.
41. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biology* 2002, **3**:1-12.
42. Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, et al. **The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants.** *Plant Biotechnology Journal* 2008, **6**:609-618.
43. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF: **Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets.** *Cancer research* 2004, **64**:5245-5250.
44. Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J: **How to do successful gene expression analysis using real-time PCR.** *Methods* 2010, **50**:227-30.
45. Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J, Bellini C, Van Wuytswinkel O: **Towards a systematic validation of references in real-time rt-PCR.** *The Plant Cell* 2008, **20**:1734-1735.
46. Coker JS, Davies E: **Selection of candidate housekeeping controls in tomato plants using EST data.** *BioTechniques* 2003, **35**:740-2, 744, 746 passim.
47. Clarke JD, Zhu T: **Microarray analysis of the transcriptome as a stepping stone towards understanding biological systems: practical considerations and perspectives.** *The Plant Journal* 2006, **45**:630-650.

48. Bastolla FM: **Seleção e avaliação de genes de referência para estudos de expressão gênica em Eucalyptus.** 2007:<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/14358>.
49. Long X-Y, Wang J-R, Ouellet T, et al. **Genome-wide identification and evaluation of novel internal control genes for Q-PCR based transcript normalization in wheat.** *Plant Molecular Biology* 2010, **74**:307-311.
50. Zeng Y, Yang T: **RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides.** *Plant Molecular Biology Reporter* 2002, **20**:417-417.
51. Dheda K, Huggett JF, Chang JS, et al. **The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization.** *Analytical Biochemistry* 2005, **344**:141-143.
52. EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization): **EPPO Crop Growth Stage Keys - Apple and Pear.** *EPPO Bulletin* 1984, **14**:291-294.
53. Walker NJ: **A technique whose time has come.** *Science* 2002, **296**:557, 559.
54. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**:402-408.

## ADDITIONAL FILE 1 – Apple tissues used for gene expression studies.

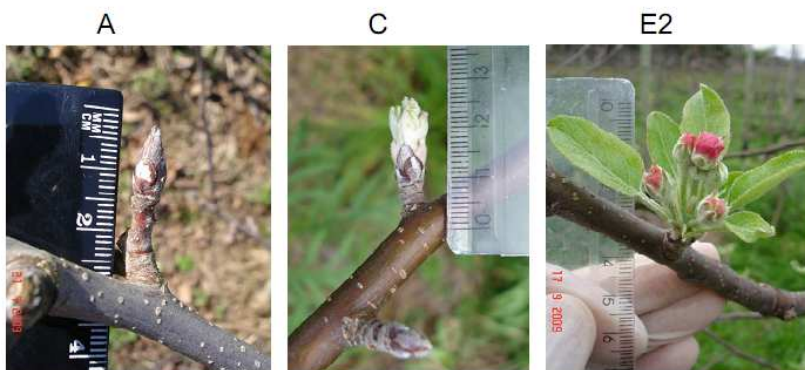
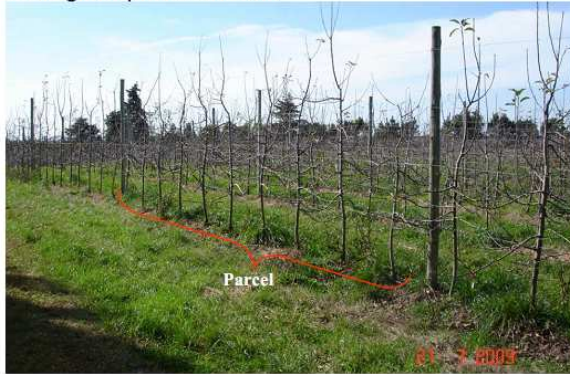
### A) Details of apple tissues used for gene expression studies.

Collection date	Development stage <sup>a</sup>	Tissue description
21/July/2009	A	dormant buds
04/September/2009	C	bud burst
19/September/2009	E2	flower buds like pink buds stage
19/September/2009	E2	young leaves
28/October/2009	I	mature leaves
28/October/2009	I	fruit set, whole, with 10 mm in diameter
08/December/2009	J	pulp of unripe fruits, with 40 mm in diameter
08/December/2009	J	skin of unripe fruits, with 40 mm in diameter
02/February/2010	M	pulp of mature fruits, with 70 mm in diameter
02/February/2010	M	skin of mature fruits, with 70 mm in diameter

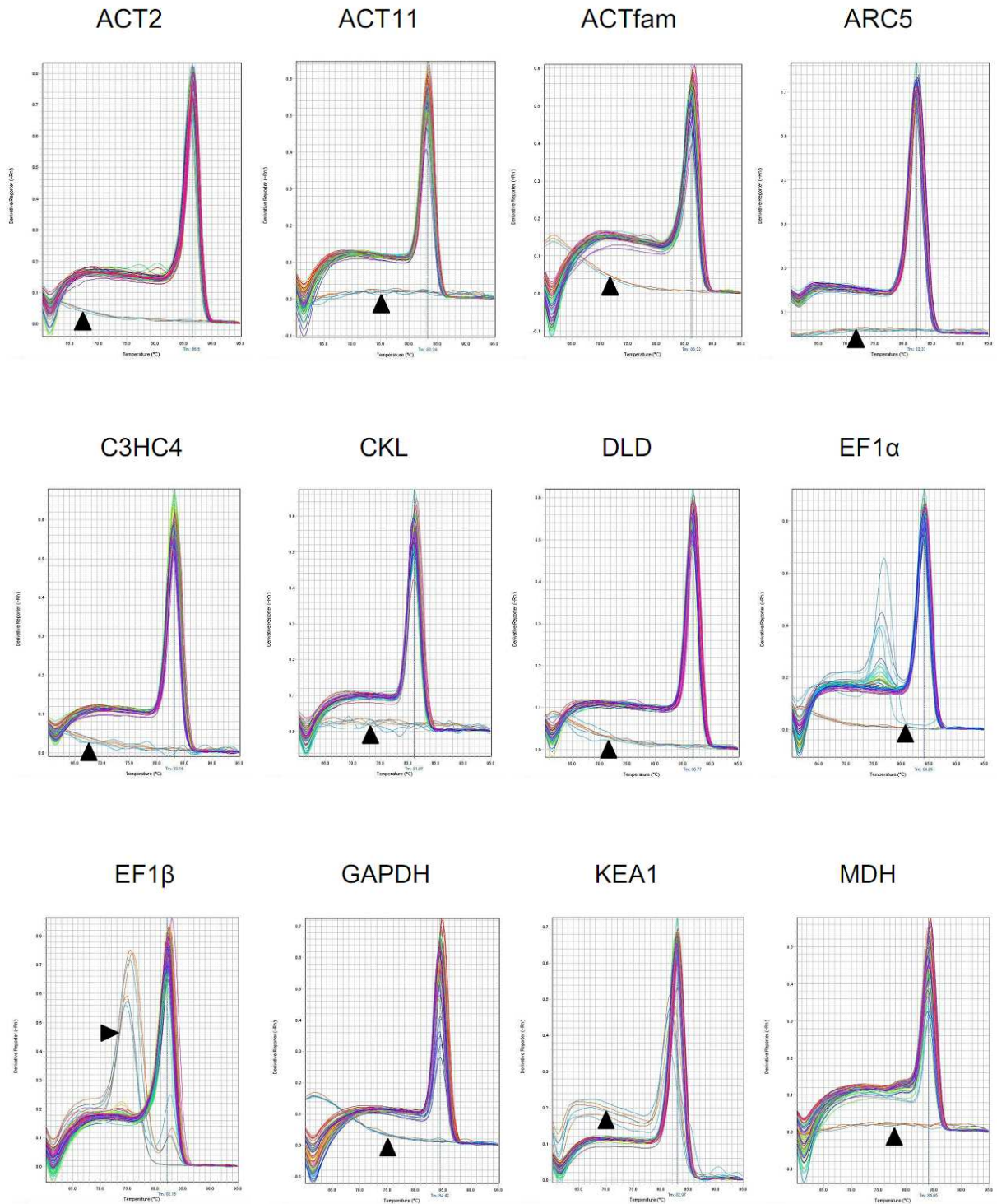
<sup>a</sup> A-J: According to Felckinger Scale, EPPO Bulletin, 1984; M as symbol for mature fruit stage.

### B) Pictures of a biological parcel trees, and apple tissues used for gene expression studies, identified by development stage code.

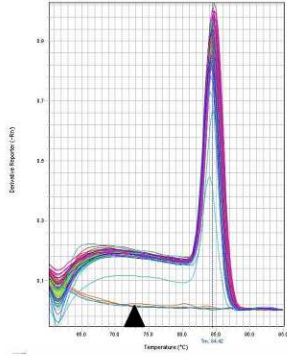
Biological parcel in field



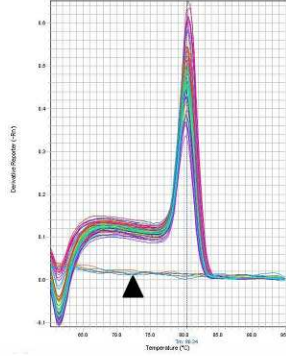
**ADDITIONAL FILE 2 – Dissociation curve for amplicon of 21 candidate reference genes and PAL, on all apple tissues evaluated.** Dissociation curve data from RT-qPCR melting step, using the derivative reporter (-Rn) of fluorescence plotted by temperature. Arrows indicate negative controls.



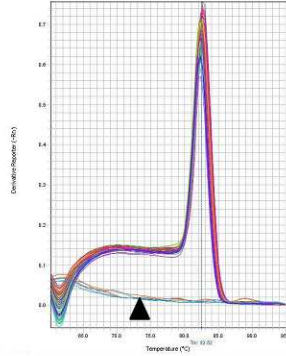
PCS



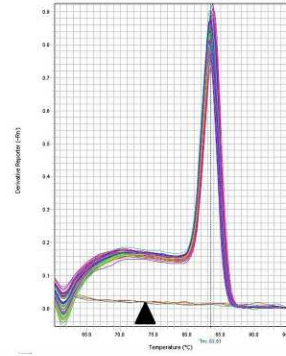
PP2A-1



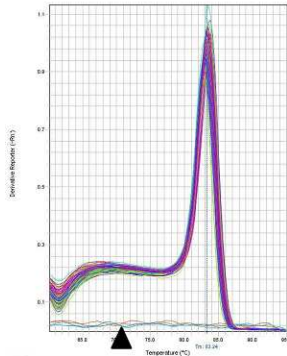
SAND



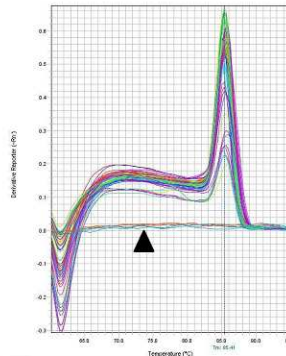
THFS



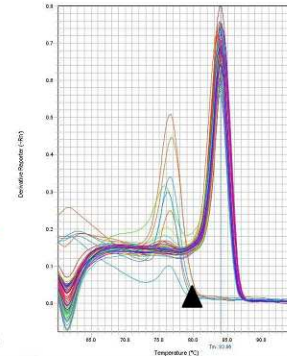
TMp1



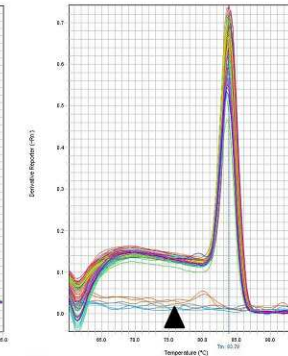
TUBa5



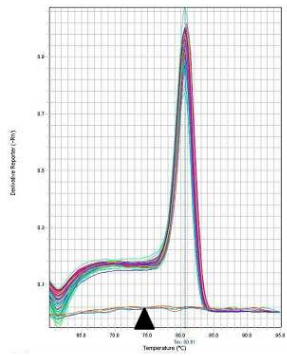
TUBβ6



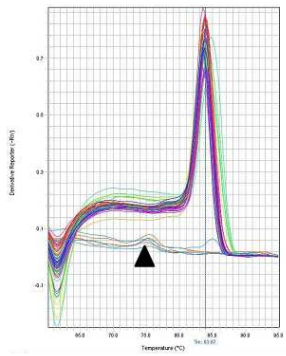
UBC10



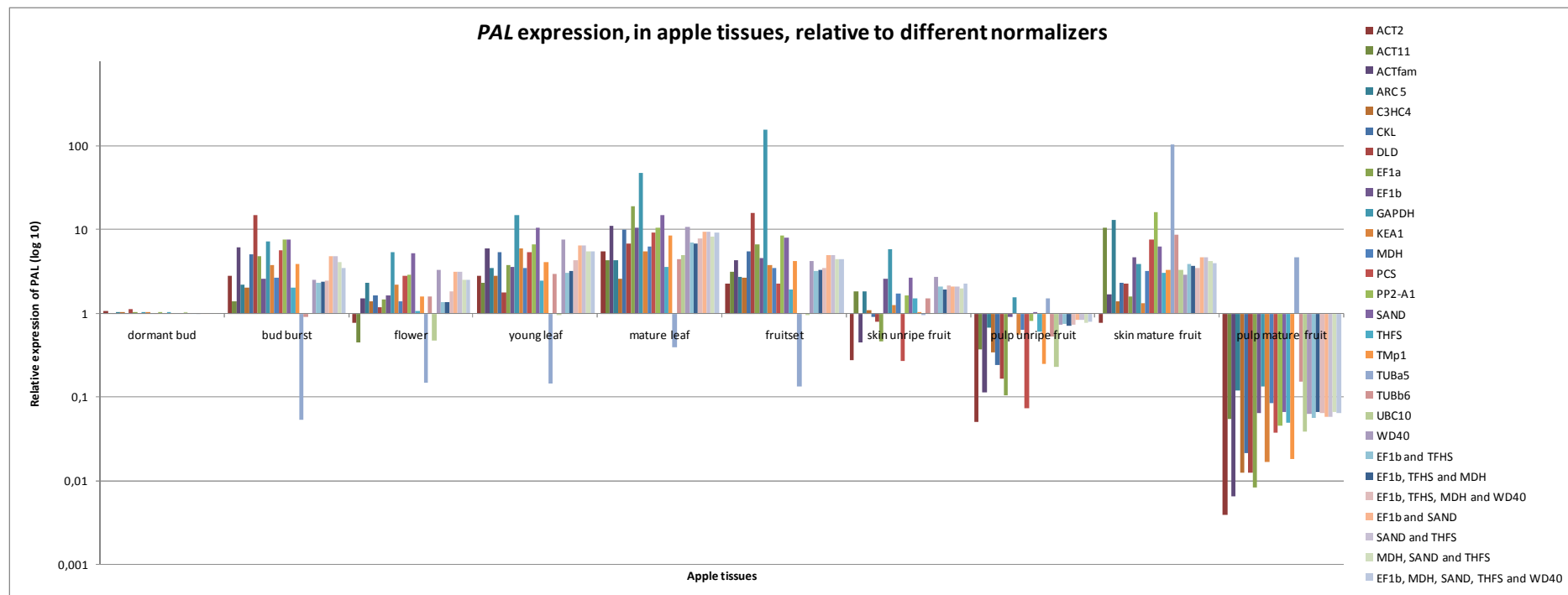
WD40



PAL



**ADDITIONAL FILE 3 – Relative expression levels of phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) in different apple tissues, normalized using the 21 candidate reference genes individually, the two most stable reference genes selected by *geNorm* (*EF1 $\beta$*  and *THFS*) or by *NormFinder* (*EF1 $\beta$*  and *SAND*), the five most stable reference genes suggested by both analyses or combinations of some of these.**



## 4. PARTE II

### *Caracterização do perfil transcricional em gemas de cultivares de macieira contrastantes para a exigência de frio durante a dormência hiberna*

#### 4.1. INTRODUÇÃO

As plantas desenvolveram mecanismos elaborados para sobreviver a condições de crescimento desfavoráveis experimentadas na natureza. A produção de gemas, por exemplo, assegura-lhes novo crescimento ou evento reprodutivo se as condições ambientais resultarem em morte de seus tecidos com crescimento e metabolismo ativos (HORVATH *et al.*, 2003). Em zonas temperadas e subtropicais, as plantas são expostas a temperaturas de congelamento a cada inverno. A dormência das gemas aparece, então, como um processo essencial para a sobrevivência dessas plantas.

Um dos desafios para a produção agrícola em climas mais quentes é o cultivo de frutíferas de clima temperado, ou de plantas que requeiram relativamente alta quantidade de frio. Para obter sucesso em tais produções é necessário usar agentes químicos ou outros meios físicos para quebrar a dormência. A aplicação de cianamida hidrogenada, por exemplo, para promover e uniformizar a brotação e floração de tais cultivos, embora apresente alta eficiência, é extremamente tóxica e agressiva ao meio ambiente (PETRI *et al.*, 2002). Além disso, as previsões das condições climáticas globais futuras, como a elevação das temperaturas médias e, logo, invernos mais amenos, chamam nossa atenção para a sustentabilidade da agricultura atual (ARORA *et al.*, 2003). Neste cenário, o desenvolvimento de cultivares frutíferas de baixa exigência de frio e boa adaptação representam a melhor alternativa.

A macieira (*Malus x domestica*) é um exemplo de cultura muito importante na Região Sul do Brasil, e, sendo tipicamente de clima temperado, passa por um período de dormência durante os meses de inverno. Todavia, para a macieira e outras frutíferas de clima temperado cultivadas nessa região, é comum a redução da produção atribuída à insuficiência de acúmulo de frio ou flutuação de temperatura no



período de repouso hibernar. Esta situação desfavorável tende a tornar-se mais intensa, considerando as projeções de aquecimento global (LIMA *et al.*, 2001). Observa-se, por outro lado, que diferentes cultivares de macieira apresentam distintas necessidades em relação à quantidade de horas de frio para a liberação das gemas desse estado de repouso. A investigação da variabilidade genética que explicaria tais exigências contrastantes pode trazer importantes subsídios para o melhoramento dessa cultura no país. Tal estudo, que intitula o presente Capítulo desta Dissertação, compõe uma das linhas de pesquisa vinculadas ao projeto “Melhoramento genético de maçã: estratégias inovadoras no desenvolvimento de cultivares adaptadas às condições climáticas sul-brasileiras (AppleClim)”, programa de pesquisa da EMBRAPA, com recursos financeiros da FINEP.

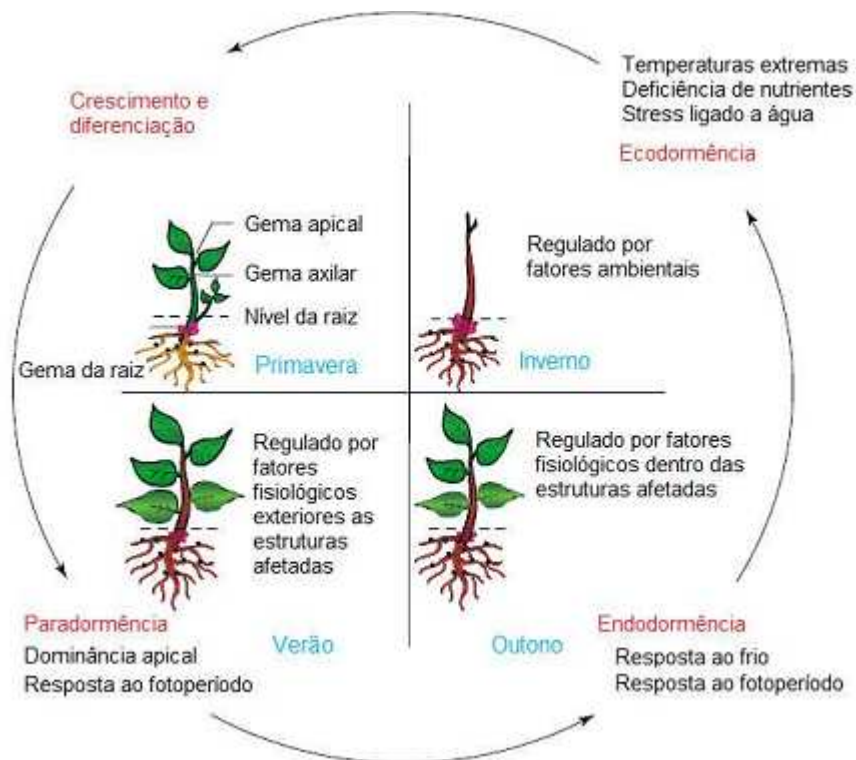
O objetivo proposto para a execução do trabalho é propiciar, em macieiras, a amplificação específica e verificar a expressão de um grupo de genes, caracterizados como associados à regulação da dormência em gemas de plantas perenes. A estratégia de análise baseia-se na técnica de PCR quantitativa em tempo real precedida de transcrição reversa (RT-qPCR), a qual permite a detecção da amplificação de sequências-alvo durante as primeiras fases da reação, oferecendo a oportunidade de se obter uma quantificação sensível e precisa dos níveis de mRNA de interesse em determinado estado fisiológico (LEKANNE-DEPREZ *et al.*, 2002).

#### **4.1.1. Dormência**

A dormência em plantas é geralmente referida como “a falta de crescimento visível em qualquer estrutura que contenha um meristema” (LANG *et al.*, 1987). Essa definição pragmática, porém, não é plenamente satisfatória. Primeiro, porque o crescimento interno dos meristemas não é literalmente “visível”, mesmo em condições de pleno metabolismo; ele está “escondido” dentro dos órgãos ou é mínimo. Segundo, porque a mera ausência de crescimento é um termo ambíguo, visto que a dormência consiste na incapacidade de retomar o crescimento (ROHDE & BHALERAO, 2007).

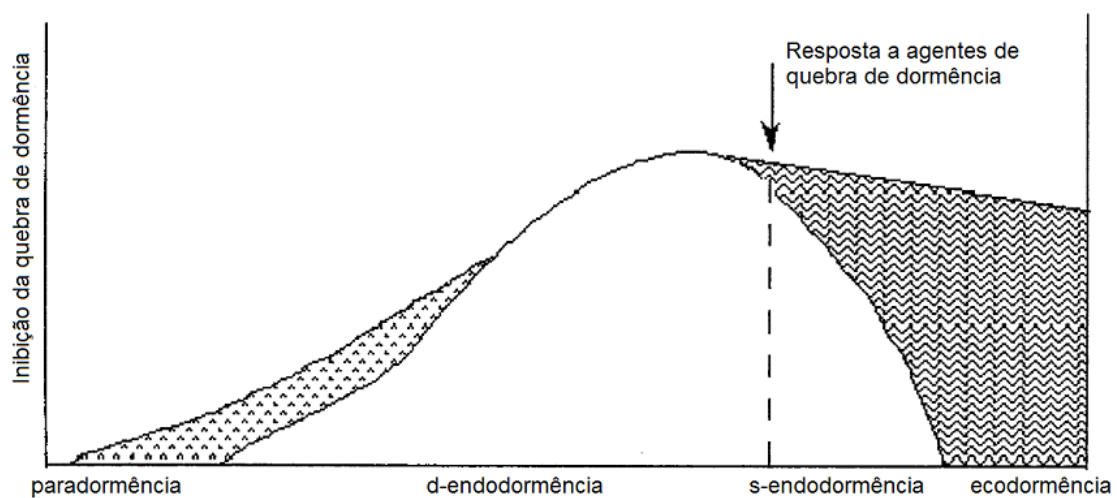
Diferentes tipos de dormência de gemas são observados em macieiras e outras espécies vegetais, conforme a descrição de LANG e colaboradores (1987). A “paradormência” é regulada por fatores fisiológicos da planta externos à estrutura

afetada, a exemplo da dominância apical ou de respostas à incidência de luz solar, principalmente durante o verão. No estado de “endodormência”, a inibição do crescimento de uma gema reside internamente à própria estrutura afetada, estimulada por respostas a alterações fotoperiódicas (diminuição da duração dos dias) ou ao frio, no outono, por exemplo. Para esse período, é sugerida também outra definição, baseada naquela para dormência em sementes: “inabilidade de iniciar crescimento a partir de meristemas sob condições favoráveis” (ROHDE & BHALERAO, 2007). Durante o inverno, a gema tem, então, seu crescimento inibido por condições ambientais desfavoráveis, em estado de “ecodormência”. Isto significa que temperaturas frias extremas, deficiência de nutrientes e estresses hídricos mantêm a gema em estado quiescente, embora a mesma seja intrínseca e fisiologicamente apta a se desenvolver (HORVATH *et al.*, 2003). Com o retorno das temperaturas mais quentes na primavera, há a completa liberação da dormência, e a gema pode crescer e se diferenciar, até que o ciclo recomeça (ROHDE & BHALERAO, 2007). Uma representação do ciclo de dormência *versus* crescimento é apresentada na Figura 1.



**Figura 1.** Diagrama dos sinais e estações do ano típicas correspondentes aos diferentes tipos de dormência vegetal. Adaptado de HORVATH *et al.* (2003).

Uma planta pode estar simultaneamente sob diferentes estádios de dormência, visto a população de gemas e a natureza quantitativa da resposta a condições favoráveis de crescimento (FAUST *et al.*, 1997). No gráfico da Figura 2 está representada a progressão gradual da dormência em gemas. Nele está indicado o período de retomada da habilidade de crescimento, quando se daria a quebra de dormência de forma natural (se as condições ambientais a favorecerem) ou artificial (respondendo a agentes químicos ou físicos que estimulam a brotação).

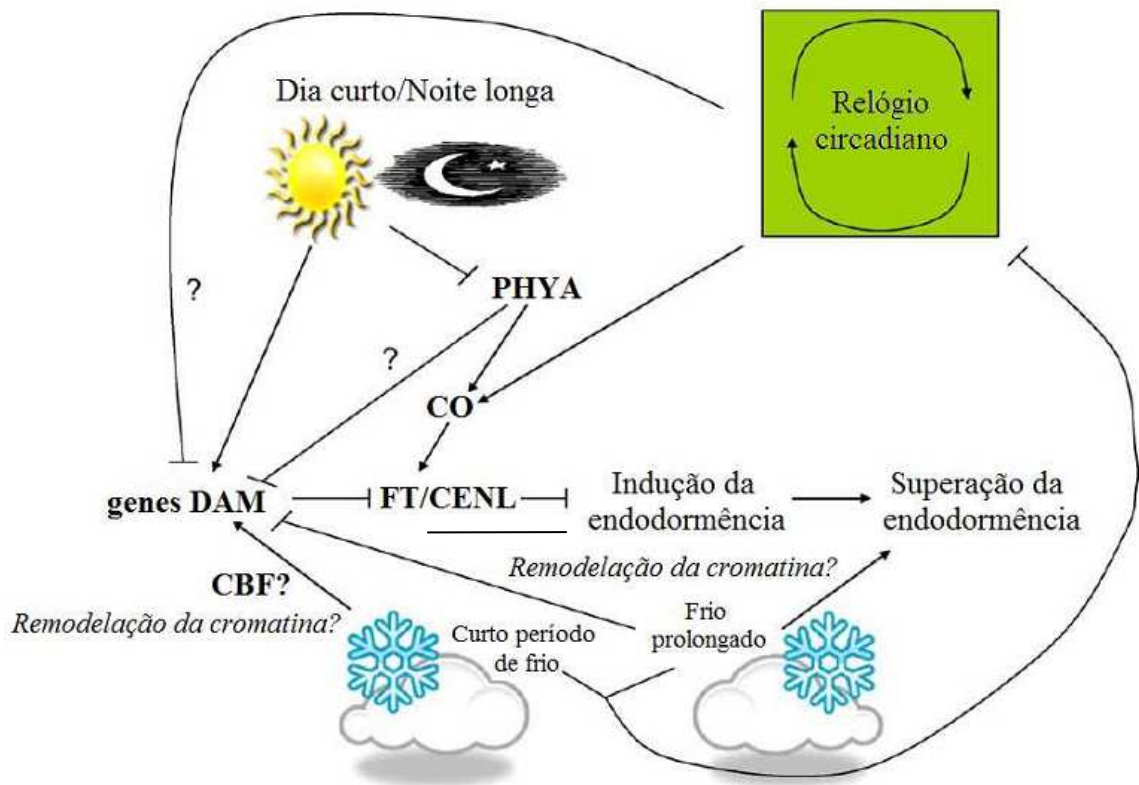


**Figura 2.** Representação esquemática da progressão da dormência em gemas. Adaptado de FAUST *et al.* (1997).

#### 4.1.2. Mecanismos moleculares da endodormência

Sinais internos e externos agem em rotas de transdução de sinais específicas e sobrepostas para a regulação da dormência em gemas (HORVATH *et al.*, 2003). Além disso, sugere-se haver uma regulação comum entre o florescimento e o cessar do crescimento que precede a indução da endodormência (HORVATH, 2009). A Figura 3 sintetiza os mecanismos moleculares que regulam esses processos, conforme o modelo proposto por Horvath (2009).

A endodormência é controlada geneticamente, induzida naturalmente pelo fotoperíodo e pelas baixas temperaturas, e liberada pós as plantas terem sido expostas a temperaturas de frio qualitativa e quantitativamente adequadas (OR *et*



**Figura 3.** Modelo de indução e liberação da endodormência de gemas de plantas perenes regulada por baixas temperaturas e dias curtos. Adaptado de HORVATH (2009).

*al.*, 2000). No modelo proposto por HORVATH (2009), em plantas que percebem o frio como o principal indutor da endodormência, genes *MADS-BOX ASSOCIADOS À DORMÊNCIA (DAM)* são induzidos pelas baixas temperaturas. A indução seria mediada pela ação de fatores do tipo CBF (*C-repeat binding factors*), também conhecidos por DREB (proteínas que se ligam a elementos responsivos à desidratação, *dehydration-responsive element-binding proteins*), e que, conhecidamente, induzem a expressão de outros genes responsivos ao frio (GILMOUR *et al.*, 2004). Possivelmente processos de remodelagem de cromatina também ocorram (LAW & SUTTLE, 2004; AUSÍN *et al.*, 2005). Por outro lado, em plantas que desencadeiam a sinalização pelo fotoperíodo, a regulação para os dias curtos é desempenhada pela ação de cascatas de sinalização mediadas pelo relógio circadiano ou diretamente por FITOCROMO A (PHYA) (AUSÍN *et al.*, 2005). Sob esta mesma condição, há a expressão do repressor CONSTANS (CO) (YANOVSKY & KAY, 2002; ROHDE & BHALERAO, 2007) e de genes *DAM*. Proteínas *DAM*

poderiam se ligar e reprimir genes *FT* (*flowering locus T*), um dos principais integradores das rotas de florescimento, que promove a ativação de genes de identidade meristemática (BÖHLENIUS *et al.*, 2006; ROHDE & BHALERAO, 2007). A repressão de *FT* é, provavelmente, aumentada também pela perda de proteínas CO (BÖHLENIUS *et al.*, 2006). A redução da expressão de *FT* é requerida para cessar o crescimento do vegetal. Assim, a repressão desses genes provavelmente leva à endodormência em gemas de plantas perenes. Temperaturas de frio prolongadas, por sua vez, reprimiriam a expressão de *DAM*, possivelmente via modificação da cromatina em regiões próximas ou correspondentes aos genes *DAM* (HORVATH, 2009).

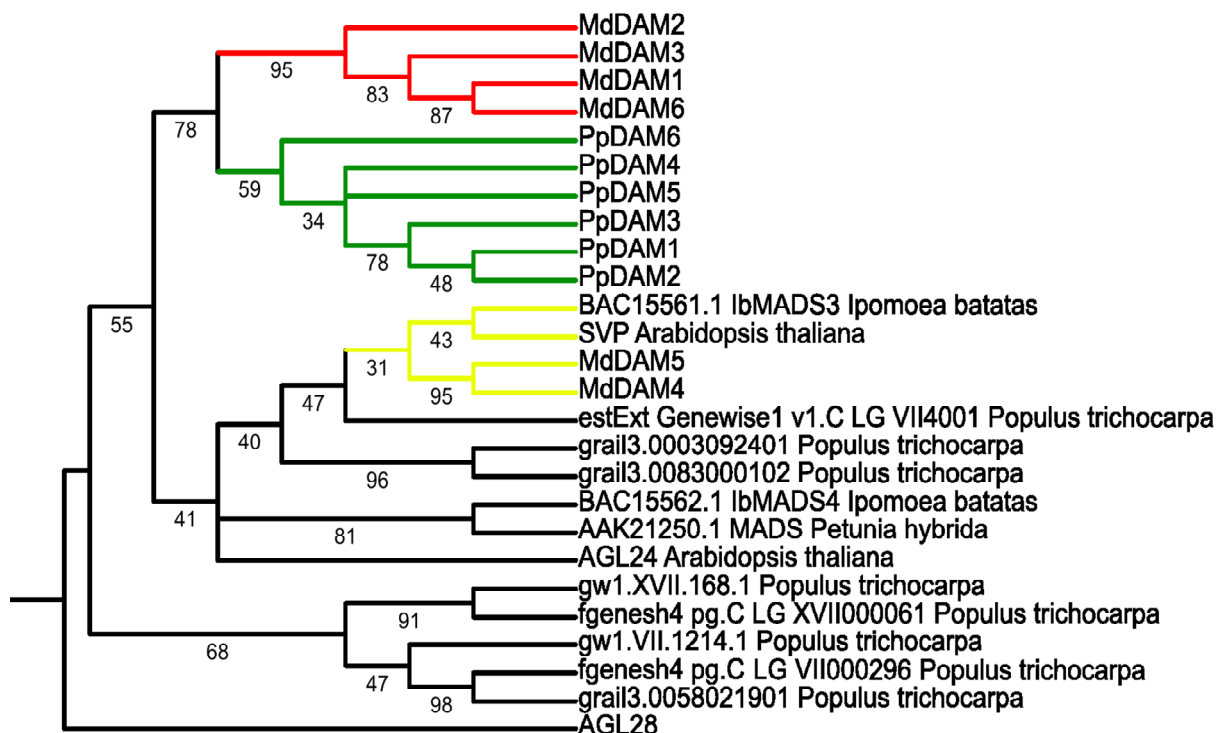
#### 4.1.3. Genes *DAM* e dados prévios do grupo

O mutante *evergrowing* (*evg*) de pêssogo (*Prunus persica*) não forma gema vegetativa terminal em resposta a condições indutoras de dormência, como dias curtos e baixas temperaturas, e os meristemas terminais mantêm crescimento contínuo, com adição de folhas e alongação de entrenós (BIELENBERG *et al.*, 2008). A região genômica da mutação *evg*, com 132 kb, foi mapeada geneticamente, sequenciada e anotada. Seis dos genes preditos formavam um agrupamento de fatores de transcrição *MADS-box* do tipo MIKC, similares aos genes *MADS-box* de batata-doce (*Ipomoea batatas*) e batata-inglesa (*Solanum tuberosum*). Genes *MADS-box* são uma família de fatores de transcrição com domínio conservado de ligação ao DNA, com papel fundamental na determinação floral de meristemas e na transição do crescimento vegetativo para o reprodutivo (KAUFMANN *et al.*, 2005). Os seis genes *MADS-box*, que não eram expressos no mutante *evg*, foram considerados candidatos para a regulação do cessar do crescimento e formação da gema terminal em pêssogo em resposta a estímulos indutores de dormência, e foram denominados genes *MADS-box* associados à dormência (*DAM*) (BIELENBERG *et al.*, 2008).

As seqüências de aminoácidos dos seis genes *DAM* de pêssogo foram comparados por *BLAST* (ALTSCHUL *et al.*, 1997) com os genomas de macieira, arábidoísis (*Arabidopsis thaliana*) e álamo (*Populus trichocarpa*). Considerando como critério de seleção um valor esperado de *BLAST* (*e-value*) menor que  $1 \times 10^{-40}$ ,

no genoma da macieira foram encontrados seis possíveis ortólogos (Figura 4), os quais foram nomeados *MdDAM1* a 6, respectivamente: MDP0000527190, MDP0000322567, MDP0000259294, MDP0000209705, MDP0000233948 e MDP0000232313 (código de acesso em <http://genomics.research.iasma.it/>).

As sequências identificadas de *Malus* foram comparadas com genes *DAM* de *A. thaliana*, *P. tomentosa*, *I. batatas* e petúnia (*Petunia x hybrida*) em uma árvore filogenética, construída com auxílio da ferramenta *online Phylogeny.fr* (DEREEPER *et al.*, 2008), na opção “*One click*”, método de máxima verossimilhança, visualizada e editada no *software interactive Tree Of Life* (LETUNIC & BORK, 2007). Essa análise permitiu agrupar em mesmo clado os genes de *MdDAM1*, 2, 3 e 6, e estes foram em seguida agrupados com os seis genes *DAM* de pêssigo, os quais formam também clado único. Os demais, *MdDAM4* e 5, correspondem possivelmente a ortólogos do gene *SVP* (*short vegetative phase*) de *Arabidopsis*, pois agrupam no mesmo clado. *SVP* é um dos responsáveis pela supressão do gene regulador de



**Figura 4.** Árvore de máxima verossimilhança construída a partir da sequência de aminoácidos de todos os possíveis ortólogos de genes *DAM*. O número no interior de cada ramo indica suporte de *bootstrap* de 100 replicatas. Ramos com suporte de *bootstrap* inferior a 30% estão colapsados. *AGL38* foi usado como grupo externo. (Luís Fernando Revers *et al.*, dados não publicados).

floração, *FT* (GREGIS *et al.*, 2009).

A análise de domínios (Figura 5) realizada pelo programa *MEME suite* (BAILEY & ELKAN, 1994) permitiu verificar que os genes *MdDAM1* a 3 representam possíveis candidatos a reguladores do processo de dormência em macieira, pois, além de localizarem-se no mesmo clado, possuem domínios semelhantes aos genes *DAM* de pêssigo. O gene *MdDAM6*, embora integre o clado *DAM*, parece possuir domínio *MIKC<sup>C</sup>*, característico do grupo, incompleto.

Name	Combined p-value	Motifs
PpDAM1	6.95e-194	1 3 8 2 7 4 6 5 9
PpDAM2	9.83e-194	1 3 8 2 7 4 6 20 5 9
PpDAM3	3.66e-178	1 3 8 2 7 4 6 5 9
PpDAM4	1.57e-163	1 3 8 2 7 4 19 5 9 16
PpDAM5	2.40e-184	1 3 8 2 7 4 6 5 9
PpDAM6	2.61e-191	1 3 8 2 7 4 6 20 5 9
MdDAM1	1.46e-193	1 3 8 23 2 4 6 5 21 12 14 15
MdDAM2	4.10e-179	1 11 17 3 8 2 4 6 5
MdDAM3	2.76e-198	1 15 11 3 8 2 4 6 5 21
MdDAM4	4.20e-147	1 3 8 2 7 4 10 9
MdDAM5	2.75e-167	1 13 22 3 8 2 7 4 10 9
MdDAM6	4.32e-134	18 12 3 8 2 7 4 6 5

**Figura 5.** Alinhamento realizado pelo programa MEME com a sequência de aminoácidos completa das proteínas DAM de pêssigo e de macieira. Os motivos extraídos estão numerados de 1 (domínio MADS MEF2-like) a 23. As sequências estão na ordem de entrada do arquivo FASTA. (Luís Fernando Revers *et al.*, dados não publicados).

#### 4.1.4. Objetivo específico

O objetivo específico que norteou o desenvolvimento deste trabalho foi, a partir das sequências identificadas como potenciais genes *MdDAM*, projetar *primers* capazes de amplificar especificamente cada um dos membros dessa família gênica e avaliar a sua expressão ao longo de um ciclo anual completo de crescimento e dormência, em gemas de macieira.

## 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1. Material vegetal

No presente trabalho foram utilizados clones de macieira (*Malus x domestica*) da variedade 'Fuji Standard' com sete anos de idade, mantidos sobre porta-enxertos M7, e cultivados em pomar experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), Caçador/SC, sob responsabilidade do Dr. Frederico Denardi. Folhas jovens foram congeladas em nitrogênio líquido a campo, e armazenadas em ultrafreezer para posterior extração de DNA. Gemas das macieiras foram coletadas considerando três parcelas biológicas, cada uma contendo quatro plantas diferentes. As amostragens foram realizadas durante o ciclo de crescimento vegetativo/reprodutivo e de dormência ao longo do ano de 2009. As datas de coletas das gemas foram: 21/janeiro, 26/março, 27/maio, 30/junho, 30/julho, 09/setembro e 25/novembro. Todas as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido a campo, e armazenadas em ultrafreezer até o momento da extração de RNA. O estabelecimento das gemas (*budset*) foi observado no final de março, e o início da brotação (*budbreak*) em 15/setembro.

### 4.2.2. Extração de DNA

Para extração de DNA, seguiu-se protocolo adaptado de LODHI *et al.* (1994) e LEFORT & DOUGLAS (1999). Folhas jovens (0,1 a 0,2 g) de 'Fuji' foram pulverizadas em nitrogênio líquido em tubo de microcentrífuga usando uma ferramenta de pressão. Foram adicionados 600 µL de tampão de extração (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA pH 8,0, 1,1 M NaCl, 0,4 M LiCl, 1% CTAB, 2% PVP40, 0,5% Tween20, 2 µL/mL β-mercaptoetanol) e 100 mg PVPP por grama de tecido pulverizado. Após forte agitação, o tubo foi mantido em banho-maria a 65 °C, por 25 minutos, e resfriado à temperatura ambiente. A seguir, 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, CIA) foram adicionados e misturados gentilmente por inversão de tubo para formar uma emulsão, durante 4 minutos. O material foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos, em temperatura ambiente, e a fase aquosa



superior foi transferida para novo tubo. À solução recuperada, foram acrescentados 250 µL de NaCl 5M e 750 µL de isopropanol gelado. Após agitação, o tubo foi acondicionado a 4 °C por, no mínimo, 20 minutos. Prosseguiu-se com nova centrifugação, a 10.000 rpm, por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o material depositado foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado, e seco em estufa a 37 °C. O DNA extraído foi ressuspendido em 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 0,1 mM EDTA pH 8,0) acrescido de RNase (20 µg/µL), e incubado à 50 °C por 15 minutos. Finalmente, quantificou-se o material extraído em espectrofotômetro, e sua integridade foi verificada em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio.

#### **4.2.3. Extração de RNA e Síntese de cDNA**

RNA total de 40 gemas amostradas para cada parcela biológica foi extraído conforme descrito no item “*Methods*”, do Capítulo 3 desta Dissertação. A pureza e a integridade do RNA, tratamento com *DNase* e transcrição reversa seguiram parâmetros e condições expostos também no item citado.

#### **4.2.4. Projeção de *primers* e teste de eficiência**

Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram projetados manual e especificamente para cada uma das seis sequências identificadas pelo grupo como potenciais genes *DAM* em macieira. Utilizou-se, para sua avaliação *in silico*, o software *OligoAnalyzer* *IDT* (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>). Os *primers* foram sintetizados pela *IDT-Integrated DNA Technologies*. Para estimar a eficiência dos oligonucleotídeos em qPCR, fez-se uso de uma mistura de amostras de cDNA representativas como material fonte, como recomendado por DERVEAUX *et al.* (2010), sobre a qual aplicou-se uma diluição seriada com fator de diluição igual a 5.

#### 4.2.5. Reação em cadeia da DNA Polimerase (PCR)

Reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em termociclador (MJ Resource) para amplificação de DNA genômico com cada par de *primer* MdDAM. Cada reação continha 1 X *PCR Buffer* (Applied Biosystems), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems), 0,4 µL dNTPs 10 µM (Invitrogen), 0,4 µL *primers* 10 µM, e 1 U de enzima *AmpliTaq* (Applied Biosystems), e água livre de nucleases (Applied Biosystems) em quantidade suficiente para volume final de 20 µL. O ensaio foi conduzido com a seguinte ciclagem: 95 °C por 2 min, 40 ciclos de amplificação (95 °C por 30 s, 60 °C, por 30 s, 72 °C, por 1 min), extensão final a 72 °C por 5 min, e resfriamento a 4 °C por 20 min. Após, os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 2%, em tampão TAE 1 X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA), e corado com brometo de etídio.

#### 4.2.6. PCR quantitativa precedida de transcrição reversa (RT-qPCR) e análise dos dados

As condições de RT-qPCR foram as mesmas usadas para o ensaio de seleção dos genes-referência de macieiras (item “*Methods*”, Capítulo 3). Para calcular a expressão relativa do gene-alvo, usou-se o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). A partir dos resultados apresentados no trabalho anterior (Capítulo 3), consideraram-se genes-referência para o presente estudo os genes *EF1β* e *WD40*, por que apresentou melhor valor M de estabilidade e suficiente *pairwise value*  $V_{2/3}$ , para a condição experimental de gemas em dormência ou não.

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nosso grupo identificou, previamente, por meio da análise de similaridade nucleotídica e motivos protéicos, seis sequências no genoma de macieira como potenciais genes *MADS-box* associados à dormência (*MdDAM*): MDP0000527190, MDP0000322567, MDP0000259294, MDP0000209705, MDP0000233948 e

MDP209705 ATGGC-----GAGGGAGAAGATTGATCAAGAAGATCGACAACGCGACAGCGAGG

MDP233948 ATGGC-----GAGGGAGAAAATTGATCAAGAAGATCGACAACGCCACGGCGAGG

MDP232313 ATGGT-----GCTCGA--ACCAAGCAATAAAG

MDP322567 AT-----GAAGATCAAGATAAAAAAGATCGACTACTTGCCGGCAAGG

MDP259294 ATGGTGAAAATAAGGAAAGAGAAGATCAAGATCAGGAGGATCGACTACTTGCCGGCAAGG

MDP527190 ATGCTGAAAAGGATGAAAGAGAAGATCAAGATCAGGAGGATCGACTACTTGCCGGCAAGG

\*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

MDP209705 CAGGTGACCTTTTCCAAGAGGAGAAGAGGCCTTTTCAAGAAGGCTGAGGAGCTCTCCGTT

MDP233948 CAGGTGACCTTTTCCAAGAGGAGAAGAGGCCTTTTGAAGAAGGCCGAGGAGCTCTCCGTT

MDP232313 C-----CTCCAAAAG-----CTTTGCCCTAATGTTTTGGGCCTTTTGCT

MDP322567 CAGGTGACCTTCTCAAAGAGGAGAAGGGGATTTTCAAGAAAGCTGGAGAGCTGTGCGATT

MDP259294 CAGGTGACCTTCTCAAAGAGGAGAAGGGGATTTTCAAGAAAGCTGAAAGAGCTGTGCGATT

MDP527190 CAGGTGACCTTCTCAAAGAGGAGAAGGGGATTTTCAAGAAAGCTGAAAGAGCTGTGCGATT

\* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

MDP209705 CTCTGTGATGCCGATATTGCTCTTATCATCTTTTCTCCACCGGAAAGCTCTTTGAATAC

MDP233948 CTCTGCGATGCCGATATTGCTCTTATCATATTTTCTCCACCGGAAAGCTCTTTGAATAC

MDP232313 GGTG-----GATTG-----AACAGTTTATCC-----CTTTATGATG--

MDP322567 CTGTGTGAATCTGAAGTTGCTGTTATCATCTTTTCTCAAAGCTGCAAGCTCTTTGATTTC

MDP259294 CTGTGTGAATCTGAAGTTGCTGTTATCATCTTTTCTCAAAGCTGCAAGCTCTTTGATTTC

MDP527190 CTGTGTGAATCTGAAGTTGCTGTTATCATCTTTTCTCAAAGCTGCAAGCTCTTTGATTTC

\*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

MDP209705 GCCAGCTCTAG-----GCTGTTCAACTTCAACTATTTTCG

MDP233948 GCCAGCTCTAG-----GCTGTTCAACTTCAACTATTTTCG

MDP232313 -----TCAAG-----GCTGTTCAACTTCAACTATTTTCG

MDP322567 TCAAGCTCCAG-----GCTGTTCAACTTCAACTATTTTCG

MDP259294 TCAAGCTCCAG-----GCTGTTCAACTTCAACTATTTTCG

MDP527190 TCAAGCTCCAG-----GCTGTTCAACTTCAACTATTTTCG

\*\* \* \*

MDP209705 -----GCTGTTCAACTTCAACTATTTTCG

MDP233948 CCTCCT--TCAACAAGGAGACTTAGATACCATTAGAGCCAGCTTCAACTTCAACTATTTTCG

MDP232313 -----GCTGTTCAACTTCAACTATTTTCG

MDP322567 CCACTRAGAACCAAGATGAGTTGGTCTCATTCCYTTTGTGATAGCCATGCCATAGAG

MDP259294 CCACCTGATAACCAAGGTGAGTTGACCTCGTTCCTATGTTGG-----

MDP527190 -----GCTGTTCAACTTCAACTATTTTCG

MDP209705 -----TATGAAGGAAATTTAGAAAAGGCACAAC

MDP233948 A-----TATGAAGGAAATTTAGAAAAGGCACAAC

MDP232313 -----TACCAAGGATGTGATTGCAAGGTACAAA

MDP322567 AGTGATAAGCTGATCATGCATGTCAACCCGCCACCAAGGATGTGATTGCAAGGTACAAT

MDP259294 -----AATTGACAAAGGCCATAGGAATACCAGGATGTGATTGCAAGGTACAAA

MDP527190 -----TACCAAGGATGTGATTGCAAGGTACAAA

\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

MDP209705 TTGCATTCAAAGAAATCTCGACAACTAGAACACCATCTCTTGAGTTACAGCTAGTGGAG

MDP233948 TTGCATTCAAAGAAATCTCGAGAACTAGAACACCATCTCTTACAGTACAGCTAGTGGAG

MDP232313 TCACAY--ACTGGTGGGGAAAAATCGGATCAAATYACGCTTACCAACTGCAGTCGGAG

MDP322567 TCACAT--ATCGGTGGGGARAAATCGGATCAACCACAGTTCATCAGTACAGTTGGAG

MDP259294 TCACAT--AC--TGGGAAAAATCGAATCAATCGATGCTTGATCAGTGCAGTTGGAG

MDP527190 TCACAT--ACTGGTGGGGAAAAATCGGATCAAWTCACGCTTACCAACTGCAGTTGGAG

\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

MDP209705 AACAGCAACTACTCCAGGTTGAGCAAGGAAATTCAGCAGAAAAAGTCACTCAACTT-----

MDP233948 AACAGCAACTACACCAGTTGAGCAAGGAAATTCAGCAGAAAAAGTCACTCAACTT-----

MDP232313 AAAGAAAACACGATCAGGCTGAGTAAGGAACTTGAGGATAAGACCCGC--AAGCTG-----

MDP322567 AAAGAAAACAATATCAGGCTGAGGAAGGAACTTGAGGATAAGAGTTGC--AAGTTG-----

MDP259294 AAAGAAAACACGATCAGGCTGAGTAAGGAACTTGAGGATAAGACCCGC--AAGCTG-----

MDP527190 AAAGAAAACACGATCAGGCTGAGTAAGGAACTTGAGGATAAGACCCGCAAGCTGAGTCT

\*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

MDP209705 -----AGGCAGATGAGAGGAGAAGAAATTCAGGACTAAGT

MDP233948 -----AGGCAGATGAGAGGAGAAGAAATTCAGGACTAAAT

MDP232313 -----AGGCATATGAGGGTGAGGACCTTCAAGACTTGGAT

MDP322567 -----AGGCAGATGAAGGGTGAGGACCTTCAAGACTTGGAT

MDP259294 -----AGGCACCTGAAGGGTGAGGACCTTCAAGACTTGGAC

MDP527190 ACTGAAACTGGTTTGTGATGCAAAAAGGCAGATGAAGGGTGAGGACCTTCAAGACTTGGAT

\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

MDP209705 TTGGAAGAACTSCAACAAATTGGAGAAGTCCCTTGAAGCTGGCTTGGGTGGCGTAGTAGAG

MDP233948 TTGGAAGAACTCCAACAATTGGAGAAGTCACTTGAAGCTGGCTTGGCCCGGTAATAGAG

MDP232313 CTGGATCAACTGAACAAGTTAGAAAAATGGTGAAGTAAGCATTTGGCCGTGTAATWAAA

MDP322567 CTGGATGAACTACAGAAGTTAGAAAAATGGTGAAGCAAGCCATGGCCGTGTGATTCAA

MDP259294 CTGGATGAACTGCAGAAGTTAGAAAAATGGTGAAGCAAGCCATGGCCGTGTGATTGAA

MDP527190 CTGGATCAACTGAACAAGTTAGAAAAATGGTGAAGCAAGCATTTGGCCGTGTGATTAAA

\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

Figura 6. (Continua...)

```

MDP209705      AAAAAGAGTGAAAAGATTATGAAAGAGATCAACGATCTTCAAAGAAATTGAATGTGCAG
MDP233948      AAAAAGAGTGAAAAAATCATGAAAGAGATCGGTGATCTTCAAAGAAAT-----
MDP232313      ACTAAGGAAAAAAGATAATGAGTGAGATTATGGCACTTACCAAACAAG-----G
MDP322567      ACT-----AAG-----G
MDP259294      ACT-----AAG-----G
MDP527190      ACT-----AAG-----G
*                               **

MDP209705      CCGATGCAATTGACGGAAGAGAATGAACGATTAAAGACAGCAAGTGGTGGAGAAATCTAAT
MDP233948      GGGATGCAATTGATGGAAGAGAATGAACGATTAAAGACAGCAAGTGGCGGAGAAATCTGAT
MDP232313      GAGCTG-AGCTTATAGAAGCTAACACMARCTAAAGCAGAGGTTGGTGTATGTTATCCGCT
MDP322567      GAGCTG-AGCTGATAGAAGCTAACACCAGCTAAAGCCACAGGATGGTGTATG-TATC--CC
MDP259294      GAGATG-AGCTTGTAGAAGCTAACACCAGCTAAAGCAGAGGATGGTGTATGTTATCCGCC
MDP527190      GAGTTG-AGCTTATAGAAGCTAACACCAGCTAAAGCAGAGGATGRTGTATGTTATCCGCT
* * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

MDP209705      GG-----CCGKAGGCTTGTTCATGTCGATTTCAGAGAACCCTGA-----TTAC
MDP233948      GG-----CCGAGGCTTGTTCAGGTCGATTTCAGAGAACCCTGA-----TTAC
MDP232313      GGAGGAGATATCGAACCCGGCGGC--GATCATG--GAGTTGGAAAACCTGAATAATGTTGG
MDP322567      AGAGGAGATATYGGACCRGAGGC--CATCCTG--GAGTTGGAAAACCTGAATAATATTGG
MDP259294      CGAGGAGATATCGGACCCGGCGGC--GATCATG--GAGTTGGAAAACCTGAATAATGGTGG
MDP527190      GGAGGAGATATCGGACCTGCGGC--GATCATG--GAGTTGGAAAACCTGAATAATGTTGG
*               **   ***   ** *   ** *   ** *   ** *   ** *   *

MDP209705      GGAGGAGGGTCAGTCATCAGAGTCTGTCCACCAATCTCTGTA---AATCTAACAGCGGTC-
MDP233948      GGAGGAGGGTCAATCATCAGAGTCTGTCCACCAATCCCTGTA---ACTCAAACAACGGTC-
MDP232313      AGAAGAAGGCATGACATCTGAATCAGCCACAAATGTCACAGCCTGCTCCAGCAGTGCTCT
MDP322567      AGAAGAAGCRTGACATCTGAATCAACCACAAATGTACCACCTGCTCCAACAGCTCTCT
MDP259294      AGAAGAAGGCGTGACATCTGAATCAGCTACAAATGTACCACAGCTCCAACAGTCCTCT
MDP527190      AGAAGAAGGCRGTGACATCTGAATCAGCCACAAATGTACCACCTGCTCCAGCAGTGCTTT
** * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      *

MDP209705      --CTCAAGACTATGACAACCTCAGTTA---CATCTCTAAAATTGGG-----
MDP233948      --CTCAAGACTACGACAGCTCCGATA---CATCTCTAAAATTGGG-----
MDP232313      TTCTCTCGAAGATGACTGCTCCGACATCTTGTCTCTCAAACCTGGG-----
MDP322567      TTCCCTTGAAGATGATTGCTCCGACATCTTGTCTCTCAAACCTGGG-----
MDP259294      TTCTCTTGAAGATGACTGCTCCGACATCTTGTCTCTCAAACCTGGG-----
MDP527190      TTCTCTCGAAGATGACTGCTCCGACATCTTGTCTCTCAAACCTGGGYGTAGTCAAGAAGCC
* * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

```

```

MDP209705      -----GTGCGCT-----
MDP233948      -----GTGCGTT-----
MDP232313      -----
MDP322567      -----
MDP259294      -----GTGTGCC-----
MDP527190      CAACTGGTTACTAGGGAGTATGTTTCAGCGCTTCCTTATTGAAAAAGCCAAGATTATCGA

MDP209705      -----
MDP233948      -----
MDP232313      -----
MDP322567      -----
MDP259294      -----GCTTTA-----ACTTCC-----
MDP527190      TTACAACAAAACAGTCGCTTGGAAAGCTTTAAAGAGAGGACTGCCAATAGATCATCCACT

MDP209705      -----TAA
MDP233948      -----TAA
MDP232313      -----GTGA
MDP322567      -----GTGA
MDP259294      -----TAA
MDP527190      CCGCAGAGACATTATCACGATTGTGGCCATGATTTTTTCAGGGCTAGAGTAA
* *

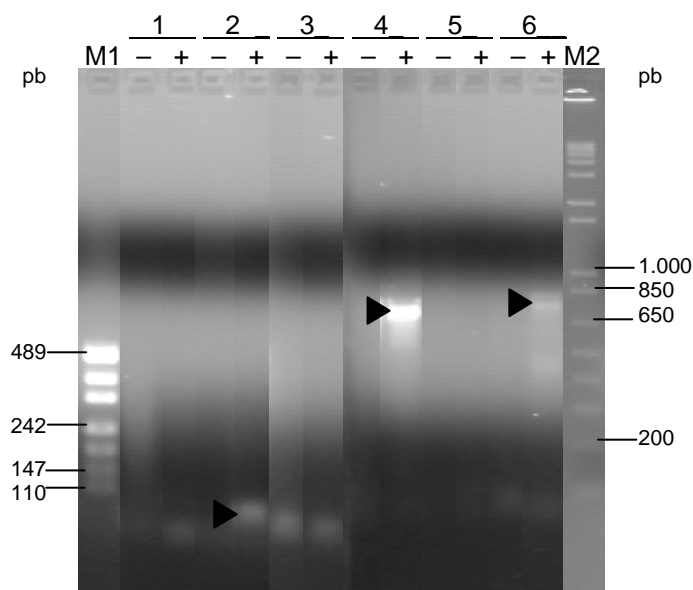
```

MUSCLE (3.8) multiple sequence alignment

**Figura 6.** Alinhamento entre as sequências dos seis potenciais genes *DAM* em macieira e os oligonucleotídeos específicos para amplificação por RT-qPCR. Setas para direita e para a esquerda indicam, respectivamente, *primers* diretos e reversos.

MDP0000232313 (*MdDAM 1* a *6*, respectivamente) (Luís Fernando Revers, comunicação pessoal). Para avaliar a expressão individual desses genes, foram projetados seis pares de oligonucleotídeos iniciadores, como apresentado na Figura 6.

Em ensaios qualitativos via PCR sobre DNA genômico de ‘Fuji *Standard*’, apenas três pares de *primers* (*MdDAM 2*, *4* e *6*) levaram à amplificação de produtos (Figura 7). Apenas para os genes *MdDAM4* e *MdDAM6* foi constatada a presença de íntrons no fragmento amplificado, visto que os tamanhos dos amplicons estimados quando a partir de cDNA estão compreendido na faixa de 87 pb a 134 pb, conforme seqüências preditas disponíveis no banco de dados do genoma da macieira.



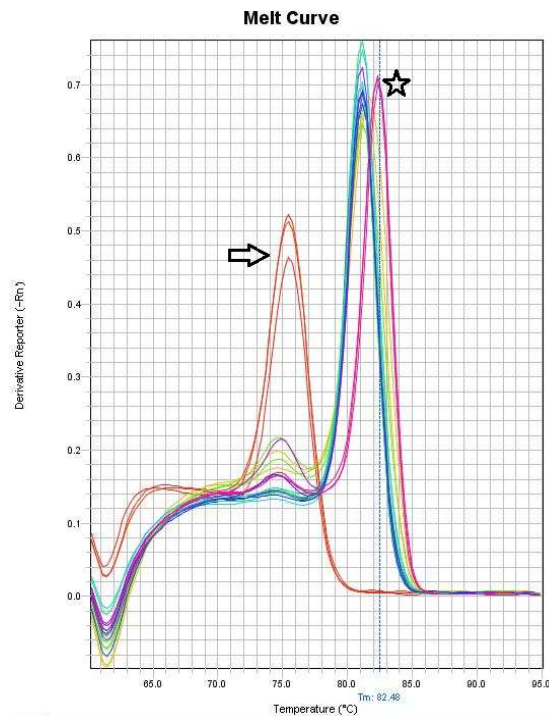
**Figura 7.** Resultados de PCRs para os seis pares de *primers* específicos para as seqüências identificadas como potenciais ortólogos de genes *DAM*, em amostras de DNA de macieira ‘Fuji *Standard*’. pb, pares de bases; M1, marcador de peso molecular *pUC19* digerido com *Hpa*II (tamanho de fragmentos identificados à esquerda); M2, marcador de peso molecular *Gene Ruler 1 kb* (Fermentas) (tamanho de fragmentos identificados à direita); 1–6, *primers* para genes *MdDAM1–6*; “–”, controle negativo da reação; “+”, controle positivo da reação; setas, amplicons observados.

Com o objetivo de testar a eficiência dos *primers* projetados, foram realizadas RT-qPCRs no modelo de curva padrão, com diluições seriadas de cDNA de gemas de 'Fuji *Standard*'. Cinco dos seis pares de oligonucleotídeos (correspondentes aos genes *MdDAM 1* a *5*) apresentaram baixíssimo rendimento, com uma eficiência inferior a 50% (ou  $E < 1,5$ ), o que inviabilizou a utilização destes iniciadores em qPCRs para a avaliação quantitativa das respectivas abundâncias de mRNA nas amostras utilizadas.

Especula-se que a baixa eficácia da amplificação observada foi resultante de diferenças entre as sequências dos genes *MdDAM*, disponíveis no banco de dados do genoma da macieira e usadas como referência para a projeção dos *primers*, em relação às sequências presentes no RNA-molde utilizado. Esse argumento é plausível considerando que o genoma disponível foi caracterizado a partir de espécimes da cultivar 'Golden Delicious' (VELASCO *et al.*, 2010), com a qual 'Fuji *Standard*' não compartilha parentais comuns (FIORAVANÇO *et al.*, 2010). Outra suposição pertinente, tendo em vista a amplificação positiva sobre DNA genômico em PCRs convencionais para os genes *MdDAM 2* e *4*, faz referência à possibilidade de que tais genes sejam resultantes de eventos de duplicação e/ou pseudogenização ao longo do processo evolutivo que separou os gêneros *Malus* e *Prunus*. Como a seleção dos genes candidatos em *Malus x domestica* foi baseada nas sequências dos genes *DAM* descritos em pêssigo (*Prunus persica*), é possível que se tenha recuperado genes com similaridade nucleotídica, porém que não sejam funcionais no contexto das gemas de macieira, isto é, não sirvam de molde para a produção de mRNAs-alvo e à síntese de cDNAs.

O único par de *primers* que alcançou melhor rendimento quantitativo ( $E = 1,75$ ) correspondeu ao gene *MdDAM6* (MDP0000232313). Em experimentos de RT-qPCR, houve amplificação de um produto único em cada amostra (Figura 8). A temperatura de dissociação ( $T_m$ ) observada para o amplicon de cada amostra de cDNA, em gemas de janeiro a setembro, foi igual a 81,38 °C. Porém, amostras extraídas das gemas de novembro de todas as parcelas biológicas apresentaram amplificação de um produto diferente daquele verificado a partir de amostras de datas anteriores, com uma  $T_m$  igual a 82,48 °C (Figura 8). Controles negativos da reação apresentaram amplicons cuja  $T_m$  (75,4 °C) difere bastante dos produtos esperados (Figura 8). Provavelmente, a amplificação foi gerada pela dimerização de

*primers*, comum qPCRs. Tal produto, entretanto, não interferiu na quantificação das amostras.

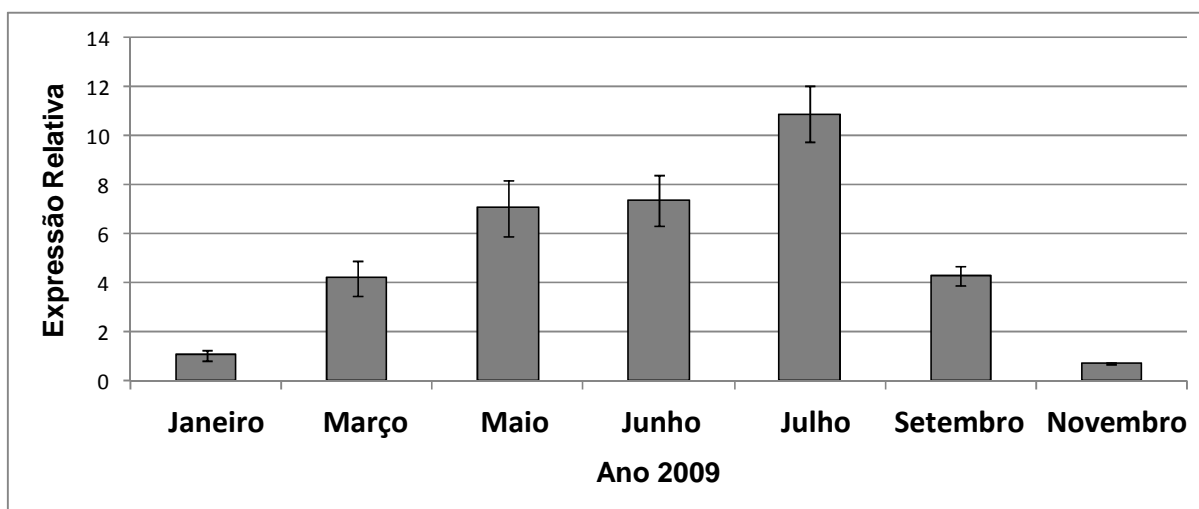


**Figura 8.** Curva de dissociação para amplicons em amostras de RNA de gemas de macieira 'Fuji Standard' após RT-qPCR para *MdDAM6*. A curva de dissociação é apresentada como a relação da derivada da fluorescência repórter (*SYBR Green I*) pela temperatura. A seta indica controles negativos; a estrela indica resultados para amostras referentes a gemas de novembro.

A expressão do gene *MdDAM6* em gemas de 'Fuji Standard', amostradas em sete datas diferentes, incluindo ciclo vegetativo e de dormência das plantas ao longo do ano de 2009, foi avaliada via RT-qPCR de forma relativa aos genes *EF1β* e *WD40*, conforme validação de normalizadores em trabalho anterior (Capítulo 3). Os dados foram analisados pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), considerando as amostras de janeiro como referência, e os resultados estão graficamente representados na Figura 9.

Observou-se claramente um aumento progressivo na expressão de *MdDAM6* a partir do verão (meados de janeiro) até o inverno (final de julho). Ao

findar a estação fria (início de setembro), os níveis de *MdDAM6* caíram e chegaram a um nível mínimo quando as temperaturas aumentaram no terço final da primavera (final de novembro).



**Figura 9.** Expressão relativa do gene *MdDAM6* de macieira em gemas da cultivar 'Fuji Standard', durante o ciclo vegetativo e de dormência ao longo do ano de 2009. A maior expressão coincidiu com os meses de inverno. Os genes *EF1 $\beta$*  e *WD40* foram usados como normalizadores. As barras indicam erro padrão das medidas quantitativas de mRNA das amostras.

Os seis genes *MADS-box* associados à dormência descritos em pêssigo foram identificados como candidatos à formação da gema terminal (*PpDAM1*, *PpDAM2* e *PpDAM4*), repressores da brotação da gema (*PpDAM5* e *PpDAM6*), ou com função desconhecida mas com expressão controlada pelo frio (*PpDAM3*) (BIELENBERG *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2009; JIMENEZ *et al.*, 2009; JIMENEZ *et al.*, 2010). O padrão de expressão observado para o *MdDAM6* de macieira se sobrepôs àqueles expostos para os genes *PpDAM5* e *PpDAM6* em pêssigo (BIELENBERG *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2009). Os períodos de maiores mudanças na expressão gênica são subsequentes ao estabelecimento da gema (*budset*), que ocorreu no final do verão/início do outono (meados de março), e anteriores à quebra de dormência (*bud break*), registrada para o final do inverno (meados de setembro). Assim, como descrito para *PpDAM5* e 6 (LI *et al.*, 2009), a função de *MdDAM6* parece estar associada ao estabelecimento e/ou à manutenção do estado



endodormente, uma vez que esse tenha sido estabelecido, em oposição a funções nos processos de cessar o crescimento vegetativo e conduzir à formação da gema.

#### 4.4. PERSPECTIVAS

O presente trabalho representou o início da investigação sobre o perfil transcricional, baseada em medidas de mRNA por RT-qPCR, de genes potencialmente relacionados ao processo de dormência em macieira. O objetivo principal é encontrar genes diferencialmente expressos em cultivares de macieiras contrastantes para a exigência de frio hibernal. Para tanto, estratégias de hibridização subtrativa supressiva (*SSH*) foram realizadas pelo grupo e ensaios prevendo a utilização de microarranjos e/ou sequenciamento de alto desempenho (*deep-sequencing*) também serão realizados. Por outro lado, a avaliação gene-a-gene será continuada, principalmente via RT-qPCR, analisando genes reconhecidamente envolvidos com os processos de formação de gemas, indução e liberação da endodormência. Quanto aos genes *DAM*, seu estudo em macieiras poderá ser ampliado pelo isolamento e caracterização dos membros dessa família gênica.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

A RT-qPCR permite realizar a quantificação de ácidos nucleicos de maneira precisa, sensível e reprodutível, pois determina valores de fluorescência correspondentes à abundância de DNA ou RNA moldes durante a fase exponencial da reação. O emprego desta técnica na análise da expressão de genes em diferentes espécies ou tratamentos experimentais está atualmente bem estabelecido. Tal aplicação exige, porém, cuidadosa seleção e validação de genes a serem usados como normalizadores dos dados de expressão para a quantificação relativa de um gene de interesse. Devido à ausência de relatos sobre tais controles para estudos de expressão em macieiras, genes tradicionalmente usados como controles internos em outras espécies ou considerados constitutivos por dados de expressão gênica global disponíveis foram avaliados neste trabalho como potenciais genes referência, em diferentes tecidos vegetativos e reprodutivos da cultivar 'Gala'. Os genes *EF1 $\beta$* , *MDH*, *SAND*, *THFS* e *WD40* foram identificados como os normalizadores mais estáveis e adequados para tais ensaios. Porém, combinações específicas de dois ou três genes-referência são necessárias e suficientes para normalizar cada conjunto de amostras analisado (Tabela 1). A expressão relativa e reconhecidamente variável de *PAL* permitiu validar os genes selecionados e a exemplificar como a escolha de controles inapropriados pode conduzir a desvios de caracterizações ou conclusões incorretas.

**Tabela 1.** Genes-referência sugeridos, a partir de análises via *geNorm* e *NormFinder*, conforme o tecido ou estágio de desenvolvimento alvos para análises de expressão gênica em macieiras.

<b>Amostras</b>	<b>Genes Referência</b>
Todas	EF1 $\beta$ , MDH, SAND, THFS e WD40
Gemas (dormente e em brotação)	EF1 $\beta$ , MDH, WD40
Folhas (jovem e madura)	ACT11, THFS, TMp1
Frutos (todos os tecidos)	EF1 $\beta$ , SAND, THFS, WD40
Desenvolvimento de frutos (jovem e maduro)	CKL, SAND, TMp1
Tecido de frutos (polpa e casca)	ARC5, EF1 $\beta$ , SAND

Um dos mais importantes aspectos da cultura da macieira, como planta perene de clima temperado, faz referência ao seu ciclo com alternância de períodos de crescimento e de dormência. Um grupo de genes com domínio *MADS-box* foi descrito em pessegueiro como associado à dormência (*DAM*). A partir da identificação de sequências no genoma da macieira de potenciais genes *MdDAM*, foram avaliados, via RT-qPCR, seus perfis de expressão em gemas ao longo de um ciclo anual. Apenas o gene *MdDAM6* apresentou amplificação coerente, e seu padrão de níveis de mRNA foi coincidente com os de genes cuja função foi associada ao estabelecimento e/ou manutenção do estado endodormente, uma vez que este tenha se estabelecido.

Portanto, o presente trabalho permitiu contribuir à biologia da macieira, uma das mais importantes espécies silviculturais para a sociedade. Por intermédio dele, apresentamos uma coleção de genes-referência fundamentais para os estudos futuros de expressão gênica em diferentes tecidos e situações do desenvolvimento das macieiras.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402 (1997).
- ANDERSEN, C. L., JENSEN, J. L. & ØRNTTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research* 64: 5245-5250 (2004).
- ARORA, R., ROWLAND, L. J. & TANINO, K. Induction and release of bud dormancy in woody perennials: a science comes of age. *HortScience* 38: 911–921 (2003).
- ARTICO, S., NARDELI, S. M., BRILHANTE, O., GROSSI-DE-SA, M. F. & ALVES-FERREIRA, M. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. *BMC Plant Biology* 10: 49-60 (2010).
- AUSÍN, I., ALONSO-BLANCO, C. & MARTÍNEZ-ZAPATER, J.-M. Environmental regulation of flowering. *The International Journal of Developmental Biology* 49: 689-705 (2005).
- BAILEY, T. L. & ELKAN, C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *In Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* (California: AAAI Press), pp. 28-36 (1994).
- BARSALOBRES-CAVALLARI, C. F., SEVERINO, F. E., MALUF, M. P. & MAIA, I. G. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *BMC Molecular Biology* 10: 1-11 (2009).

- BHATTI, S. & JHA, G. Current trends and future prospects of biotechnological interventions through tissue culture in apple. *Plant Cell Reports* 29: 1215-1225 (2010).
- BIELLENBERG, D. G., WANG, Y., LI, Z., ZHEBENTYAYEVA, T., FAN, S., REIGHARD, G. L., SCORZA, R. & ABBOTT, A. G. Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation. *Tree Genetics & Genomes* 4: 495-507 (2008).
- BOTELHO, R. V. & MULLER, M. M. L. Evaluation of garlic extract on bud dormancy release of "Royal Gala" apple trees. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 47: 738-741 (2007).
- BOUDICHEVSKAIA, A., FLACHOWSKY, H. & DUNEMANN, F. Identification and molecular analysis of candidate genes homologous to *HcrVf* genes for scab resistance in apple. *Plant Breeding* 128: 84-91 (2009).
- BRUNNER, A. M., YAKOVLEV, I. A. & STRAUSS, S. H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biology* 4: 14-20 (2004).
- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G., VANDESOMPELE, J. & WITWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55: 611-622 (2009).
- BÖHLENIUS, H., HUANG, T., CHARBONNEL-CAMPAA, L., BRUNNER, A. M., JANSSON, S., STRAUSS, S. H. & NILSSON, O. CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science* 312: 1040-1043 (2006).

- CAMILO, A. P. & DENARDI, F. Cultivares: descrição e comportamento no Sul do Brasil. *In: A cultura da macieira* (Florianópolis: EPAGRI), pp. 113-168 (2006).
- CZECHOWSKI, T., STITT, M., ALTMANN, T. & UDVARDI, M. K. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization. *Plant Physiology* 139: 5-17 (2005).
- DAVEY, M. W., KENIS, K. & KEULEMANS, J. Genetic control of fruit vitamin C contents. *Plant Physiology* 142: 343-351 (2006).
- DE ALMEIDA, M. R. DE, RUEDELL, C. M., RICACHENEVSKY, F. K., SPEROTTO, R. A., PASQUALI, G. & FETT-NETO, A. G. Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during in vitro adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill. *BMC Molecular Biology* 11, 73-84 (2010).
- DENARDI, F. & SECCON, J. J. Castel Gala' - mutacao da macieira `Gala' com baixa necessidade de frio e maturacao precoce. *Agropecuaria Catarinense* 18: 78-82 (2005).
- DEREEPER, A., GUIGNON, V., BLANC, G., AUDIC, S., BUFFET, S., CHEVENET, F., DUFAYARD, J-F., GUINDON, S., LEFORT, V., LESCOT, M., CLAVERIE, J-M. & GASCUEL, O. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* 36: W465-469 (2008).
- DERVEAUX, S., VANDESOMPELE, J. & HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 50: 227-30 (2010).
- DHEDA, K., HUGGETT, J. F., CHANG, J. S., KIM, L. U., BUSTIN, S A, JOHNSON, M. A., ROOK, G. A. W. & ZUMLA, A. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Analytical Biochemistry* 344: 141-143 (2005).

EMBRAPA UVA E VINHO. Sistemas de Produção 1: Produção Integrada de Maçãs no Brasil. (2003). Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/ProducaoIntegradaMaca/>

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M., BORGES, A. A., BORGES-PÉREZ, A. & PÉREZ, J. A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biology* 8: 131-142 (2008).

FAUST, M., EREZ, A., ROWLAND, L. J., WANG, S. Y. & NORMAN, H. A. Bud dormancy in perennial fruit trees: physiological basis for dormancy induction, maintenance, and release. *HortScience* 32: 623-629 (1997).

FERREIRA, P. Yes, nós temos maçãs. *Inovação em Pauta* 5: 43-47 (2009).

FIORAVANÇO, C., GIRARDI, C. L., CZERMAINSKI, A. B. C., SILVA, G. A., NACHTIGALL, G. R. & OLIVEIRA, P. R. D. Cultura da macieira no Rio Grande do Sul: análise situacional e descrição varietal - Documentos 71 (Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho) pp. 60 (2010).

FOLTA, K. M. & GARDINER, S. E. (eds.). *Plant Genetics/Genomics*, vol. 6: Genetics and Genomics of Rosaceae (New York: Springer) (2009).

GILMOUR, S. J., FOWLER, S. G. & THOMASHOW, M. F. *Arabidopsis* transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Molecular Biology* 54: 767–781. (2004).

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 30: 503-512 (2002).

GREGIS, V., SESSA, A., DORCA-FORNELL, C. & KATER, M. M. The *Arabidopsis* floral meristem identity genes *AP1*, *AGL24* and *SVP* directly repress class B and C floral homeotic genes. *The Plant Journal* 60: 626-637 (2009).

- HAUAGGE, R. & CUMMINS, J. N. Seasonal variation in intensity of bud dormancy in apple cultivars and related *Malus* species. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116: 107-115 (1991).
- HORVATH, D., ANDERSON, J. V., CHAO, W. S. & FOLEY, M. E. Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends in Plant Science* 8: 534-540 (2003).
- HORVATH, D. Common mechanisms regulate flowering and dormancy. *Plant Science* 177: 523-531 (2009).
- IBRAF - Instituto Brasileiro de Frutas. Estatísticas de Frutas Frescas. (2010). Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/>
- IGLESIAS, I. C., CARBÓ, J., BONANY, J. & SANGRA, R. M. Innovación varietal en manzano. *Revista de Fruticultura* 1: 13-30 (2009).
- ISKANDAR, H. M., SIMPSON, R. S., CASU, R. E., BONNETT, G. D., MACLEAN, D. J. & MANNERS, J. M. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 325-337 (2004).
- JAIN, M., NIJHAWAN, A., TYAGI, A. K. & KHURANA, J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345: 646-651 (2006).
- JIAN, B., LIU, B., BI, Y., HOU, W., WU, C. & HAN, T. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. *BMC Molecular Biology* 9: 59-72 (2008).
- JIMÉNEZ, S., LAWTON-RAUH, A. L., REIGHARD, G. L., ABBOTT, A. G. & BIELENBERG, D. G. Phylogenetic analysis and molecular evolution of the



- dormancy associated *MADS-box* genes from peach. *BMC Plant Biology* 9: 81-92 (2009).
- JIMÉNEZ, S., LI, Z., REIGHARD, G. L. & BIELENBERG, D. G. Identification of genes associated with growth cessation and bud dormancy entrance using a dormancy-incapable tree mutant. *BMC Plant Biology* 10: 25-35 (2010).
- JUNG, S., STATON, M., LEE, T., BLENDIA, A., SVANCARA, R., ABBOTT, A. & MAIN, D. GDR (Genome Database for Rosaceae): integrated web-database for Rosaceae genomics and genetics data. *Nucleic Acids Research* 36: D1034-1040 (2008).
- KAUFMANN, K., MELZER, R. & THEISSEN, G. *MIKC*-type *MADS*-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene* 347: 183-198 (2005).
- KELLERHALS, M. Introduction to Apple (*Malus x domestica*). In Plant Genetics and Genomics. Vol 6: Genetics and Genomics of Rosaceae K. M. Folta and Susan E. Gardiner, eds. (New York: Springer), pp. 73-84 (2009).
- KOUASSI, A. B., DUREL, C-E., COSTA, F., TARTARINI, S., WEG, E., EVANS, K., FERNANDEZ-FERNANDEZ, F., GOVAN, C., BOUDICHEVSKAJA, A., DUNEMANN, F., ANTOFIE, A., LATEUR, M., STANKIEWICZ-KOSYL, M., SOSKA, A., TOMALA, K., LEWANDOWSKI, M., RUTKOVSKI, K., ZURAWICZ, E., GUERRA, W. & LAURENS, F. Estimation of genetic parameters and prediction of breeding values for apple fruit-quality traits using pedigreed plant material in Europe. *Tree Genetics & Genomes* 5, 659-672 (2009).
- KULCHESKI, F. R., MARCELINO, F. C., NEPOMUCENO, A. L., ABDELNOOR, R. V. & MARGIS, R. The use of microRNAs as reference genes for quantitative polymerase chain reaction in soybean. *Analytical Biochemistry* 406, 185-192 (2010).

- KUMAR, S., VOLZ, R. K., ALSPACH, P. A. & BUS, V. G. M. Development of a recurrent apple breeding programme in New Zealand: a synthesis of results, and a proposed revised breeding strategy. *Euphytica* 173: 207-222 (2009).
- LABUSCHAGNE, I. F., LOUW, J. H., SCHMIDT, K. & SADIE, A. Genetic variation in chilling requirement in apple progeny. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 663-672 (2002).
- LANG, G. A., EARLY, J. D., MARTIN, G. C. & DARNELL, R. L. Endodormancy, paradormancy, and ecodormancy - physiological terminology and classification for dormancy research. *Hortscience* 22: 371-377 (1987).
- LATA, B. Relationship between apple peel and the whole fruit antioxidant content: Year and cultivar variation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 663-671 (2007).
- LAW, R. D. & SUTTLE, J. C. Changes in histone H3 and H4 multi-acetylation during natural and forced dormancy break in potato tubers. *Physiologia Plantarum* 120: 642-649 (2004).
- LEFORT, F. & DOUGLAS, G. C. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Annals of Forest Science* 56: 259-263 (1999).
- LEGAVE, J. M., FARRERA, I., ALMERAS, T. & CALLEJA, M. Selecting models of apple flowering time and understanding how global warming has had an impact on this trait. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 83: 76-84 (2008).
- LEKANNE DEPREZ, R. H., FIJNVANDRAAT, A. C., RUIJTER, J. M. & MOORMAN, A. F. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Analytical Biochemistry* 307: 63-69 (2002).

- LETUNIC, I. & BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 23: 127-128 (2007).
- LI, Z., REIGHARD, G. L., ABBOTT, A. G. & BIELENBERG, D. G. Dormancy-associated *MADS* genes from the *EVG* locus of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] have distinct seasonal and photoperiodic expression patterns. *Journal of Experimental Botany* 60: 3521-30 (2009).
- LIMA, M. A., CABRAL, O. M. R. & MIGUEZ, J. D. G. (eds.). Mudanças climáticas globais e a agropecuária brasileira (Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente) pp. 397 (2001).
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25: 402-408 (2001).
- LODHI, M. A., GUANG-NING, Y., WEEDEN, N. F. & REISCH, B. I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter* 12: 6-13 (1994).
- LØVDAL, T. & LILLO, C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Analytical Biochemistry* 387: 238-242 (2009).
- MARIC, S., LUKIC, M., CEROVIC, R., MITROVIC, M. & BOSKOVIC, R. Application of molecular markers in apple breeding. *Genetika* 42: 359-375 (2010).
- MELLO, L. M. R. DE, GARAGORRY, F. L. & CHAIB-FILHO, H. Evolução e dinâmica da produção de maçã no Brasil no período de 1975 a 2003 - Documentos 66. (Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho) pp. 38 (2007).
- NEWCOMB, R., CROWHURST, R. & GLEAVE, A. Analyses of expressed sequence tags from apple. *Plant Physiology* 141: 147-166 (2006).

- NICOT, N., HAUSMAN, J. F., HOFFMANN, L. & EVERS, D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 56: 2907-2914 (2005).
- OR, E., VILOZNY, I., EYAL, Y. & OGRODOVITCH, A. The transduction of the signal for grape bud dormancy breaking induced by hydrogen cyanamide may involve the SNF-like protein kinase GDBRPK. *Plant Molecular Biology* 43: 483–494 (2000).
- PETRI, J. L. Induction of apple tree budding by hydrogenated cyanamide and mineral oil under influence of temperature. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 32: 71-75 (1997).
- PETRI, J. L., PALLADINI, L. A. & POLA, A. C. Dormência e indução da brotação da macieira. *In Manual da cultura da macieira* (Florianópolis: EPAGRI), pp. 261-298 (2002).
- PFAFFL, M. W., TICHOPAD, A., PRGOMET, C. & NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26: 509-515 (2004).
- POTTER, D., ERIKSSON, T., EVANS, R. C., OH, S., SMEDMARK, J. E. E., MORGAN, D. R., KERR, M., ROBERTSON, K. R., ARSENAULT, M., DICKINSON, T. A. & CAMPBELL, C. S. Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution* 266: 5-43 (2007).
- RADONIC, A., THULKE, S., MACKAY, I. M., LANDT, O., SIEGERT, W. & NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313: 856-862 (2004).
- REID, K., OLSSON, N., SCHLOSSER, J., PENG, F. & LUND, S. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference

- genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology* 6: 27-37 (2006).
- REMANS, T., SMEETS, K., OPDENAKKER, K., MATHIJSEN, D., VANGRONSVELD, J. & CUYPERS, A. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta* 227: 1343-1349 (2008).
- RICHARDSON, E. A., SEELY, S. D. & WALKER, D. R. A model for estimating the completion of rest for "Redhaven" and "Elberta" peach trees. *HortScience* 1: 331-332 (1974).
- ROHDE, A. & BHALERAO, R. P. Plant dormancy in the perennial context. *Trends in Plant Science* 12: 217-23 (2007).
- SCHMIDT, G. W. & DELANEY, S. K. Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Molecular Genetics and Genomics* 283: 233-41 (2010).
- SOGLIO, V., COSTA, F., MOLTHOFF, J. W., WEEMEN-HENDRIKS, W. M. J., SCHOUTEN, H. J. & GIANFRANCESCHI, L. Transcription analysis of apple fruit development using cDNA microarrays. *Tree Genetics & Genomes* 5: 685-698 (2009).
- TONG, Z., GAO, Z., WANG, F., ZHOU, J. & ZHANG, Z. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Molecular Biology* 10: 71-83 (2009).
- TU, L., ZHANG, X., LIU, D., JIN, S., CAO, J., ZHU, L., DENG, F., TAN, J. & ZHANG, C. Suitable internal control genes for qRT-PCR normalization in cotton fiber development and somatic embryogenesis. *Chinese Science Bulletin* 52: 3110-3117 (2007).

USDA - United States Department of Agriculture. National Nutrient Database for Standard Reference - Release 23. (2010). Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/>

VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A. & SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3: 1-12 (2002).

VELASCO, R., ZHRKIKH, A., AFFOUTIT, J., DHINGRA, A., CESTAROL, A., KALYANARAMAN, A., FONTANA, P., BHATNAGAR, S. K., TROGGIO, M., PRUSS, D., SALVIL, S., PINDO, M., BALDI, P., CASTELLETTIL, S., CAVAIUOLO, M., COPPOLA, G., COSTA, F., COVA, V., DAL RI, A., GOREMYKIN, V., KOMJANC, M., LONGHI, S., MAGNAGO, P., MALACARNE, G., MALNOYL, M., MICHELETTI, D., MORETTO, M., PERAZZOLLI, M., SIAMMOUR, A., VEZZULLI, S., ZINI, E., ELDREDGE, G., FITZGERALD, L. M., GUTIN, N., LANCHBURY, J., MACALMA, T., MITCHELL, J.T., REID, J., WARDELL, B., KODIRA, C., CHEN, Z., DESANY, B., NIAZI, F., PALMER, M., KOEPKE, T., JIWAN, D., SCHAEFFER, S., KRISHNAN, V., WU, C., CHU, V. T., KING, S. T., VICK, J., TAO, Q., MRAZ, A., STORMO, A., STORMO, K., BOGDEN, R., EDERLE, D., STELLA, A., VECCHIETTI, A., KATER, M. M., MASIERO, S., LASSERRE, P., LESPINASSE, Y., ALLAN, A. C., BUS, V., CHAGNÉ, D., CROWHURST, R. N., GLEAVE, A.P., LAVEZZO, E., FAWCETT, J.A., PROOST, S., ROUZÉ, P., STERCK, L., TOPPO, S., LAZZARI, B., HELLENS, R. P., DUREL, C. E., GUTIN, A., BUMGARNER, R. E., GARDINER, S. E., SKOLNICK M., EGHOLM, M., PEER, Y. V., SALAMINI, F. & VIOLA, R. The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature Genetics* 42: 833-839 (2010).

WALKER, N. J. A technique whose time has come. *Science* 296: 557, 559 (2002).

YANOVSKY, M. J. & KAY, S. A. Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* 419: 308-312 (2002).

## ANEXO I – CURRICULUM VITAE

### **Pâmela Perini**

#### **Dados pessoais:**

Data Nascimento: 30/09/1985 RG: 6067948239  
Naturalidade: Caxias do Sul/RS Estado Civil: Solteira  
Endereço: Rua Treze de Maio, 234-A – Bairro: São Luiz – Farroupilha/RS – CEP: 95180-000  
E-mail: [pamela.perini@yahoo.com.br](mailto:pamela.perini@yahoo.com.br) Telefone: (54) 3261.2840 Celular: (51) 9693.2105

#### **Formação Acadêmica:**

- 2009 - atual **Mestrado em Biologia Celular e Molecular**, PPGBCM, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS.  
Título da pesquisa: **Seleção de genes-referência para estudos de expressão gênica em macieiras**  
Orientação: Dr. Giancarlo Pasquali (Lab. Biologia Molecular Vegetal, CBIOT, UFRGS) ([pasquali@cbiot.ufrgs.br](mailto:pasquali@cbiot.ufrgs.br)) ; Dra. Márcia A. N. Pinheiro Márgis (Núcleo de Genômica Funcional de Plantas, Depto. Genética, UFRGS) ([marcia.margis@ufrgs.br](mailto:marcia.margis@ufrgs.br))  
Co-orientação: Dr. Luis Fernando Revers (Lab. Genética Molecular de Plantas, EMBRAPA Uva e Vinho ([luis@cnpuv.embrapa.br](mailto:luis@cnpuv.embrapa.br)))
- 2007 - 2008 **Bacharelado em Ciências Biológicas - Ênfase Molecular, Celular e Funcional**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (**UFRGS**), Porto Alegre/RS.
- 2003 - 2006 **Licenciatura em Ciências Biológicas**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (**UFRGS**), Porto Alegre/RS.

#### **Formação Complementar:**

- Mar/2008 - Estágio de Iniciação Científica no **Laboratório de Biologia Molecular Vegetal**, EMPRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS.  
Dez/2008 Orientação: Dr. Luis Fernando Revers ([luis@cnpuv.embrapa.br](mailto:luis@cnpuv.embrapa.br))  
Pesquisa inserida no projeto intitulado 'Inovações tecnológicas para a modernização do setor da Maçã', com o estudo da dormência hiberna em gemas de macieiras.
- Ago/2007 - Estágio de Iniciação Científica no **Laboratório de Ecologia Química e Quimiotaxonomia Vegetal**, Departamento de Botânica, UFRGS, Porto Alegre/RS.  
Dez/2008 Orientação: Prof. Dr. Geraldo Soares ([glgsoares@gmail.com.br](mailto:glgsoares@gmail.com.br)).  
Trabalho de Conclusão de Curso com pesquisa em Quimiotaxonomia, avaliando ocorrência de metabólitos secundários na tribo basal de Asteraceae e seus grupos-irmãos.

- Julh/2008 Curso **Noções e Aplicações em Bioinformática** (40h, teórico-prático). Promovido pela EMBRAPA Trigo, CNPq, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, e Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo/RS. Coordenação: Natália Martins ([natalia@cenargen.embrapa.br](mailto:natalia@cenargen.embrapa.br))
- Ago/2007 Curso Avançado de **Metodologia de Radioisótopos** – Módulo I: Segurança e Proteção Radiológica (45h), Porto Alegre/RS. Realizado e certificado pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) – unidade RS: UFRGS, Porto Alegre/RS. (Coordenação: [falabarse@cnen.gov.br](mailto:falabarse@cnen.gov.br))
- Julh/2007 IV Curso de Inverno – **Tópicos em Fisiologia Comparativa** (120h), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo/SP. Aulas teórico-práticas, sob coordenação da Profa. Dra. Lucile M. Floeter-Winter ([lucile@usp.br](mailto:lucile@usp.br)), e desenvolvimento de projeto de pesquisa (em ensaios biológicos para avaliar a atividade de produtos naturais e cultura *in vitro* de neurônios), sob orientação da Msc. Jeanete L. Naves e Dra. Merari F. Ramires Ferrari.
- Jan/2006 - Jul/2007 Estágio de Iniciação à Tecnologia Industrial no **Laboratório de Métodos Biofísicos de Análises**, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre/RS. Orientação: Prof. Dr. Tarso Ledur Kist ([tarso@orion.ufrgs.br](mailto:tarso@orion.ufrgs.br)). Pesquisas relacionadas à separação e seqüenciamento de DNA em solução livre, e análises de drogas terapêuticas em eletroforese capilar; e recuperação de proteínas usando nanopartículas magnéticas.
- Jan/2006 - Fev/2006 XV Programa de Bolsas de Verão no **Laboratório Nacional de Luz Síncrotron** (LNLS), Campinas/SP. (320h de estágio prático em Laboratório de Biologia Molecular.) Orientação: Prof. Dr. Jörg Kobarg ([jkobarg@lnls.br](mailto:jkobarg@lnls.br)). Participação em linha de pesquisa com atividades de purificação e estudos estruturais da proteína humana FEZ1, envolvida no crescimento de neuritos.
- Out/2003 - Dez/2005 Estágio de Iniciação Científica no **Laboratório de Biologia Molecular Vegetal**, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre/RS. Orientação: Prof. Dr. Giancarlo Pasquali ([pasquali@cbiot.ufrgs.br](mailto:pasquali@cbiot.ufrgs.br)). Pesquisa para melhoramento genético de *Eucalyptus*, envolvendo técnica de mRNA-antisense e transgenia em tabaco para genes de produção de lignina.

### Atuação em Licenciatura:

- Ago/2006 - Dez/2006 Estágio Curricular: Prática de Ensino em Ciências - **Ensino Fundamental**. Local: E. E. E. F. Gal. Daltro Filho (Porto Alegre/RS; 51-3343.1108) – Turma: 6ª série. Profa. Orientadora/ UFRGS: Carolina Cavedon ([carolcavedon@yahoo.com.br](mailto:carolcavedon@yahoo.com.br))
- Mar/2006 - Jul/2006 Estágio Curricular: Prática de Ensino em Biologia – **Ensino Médio**. Local: E. Técnica Estadual Irmão Pedro (Porto Alegre/RS; 51-3395.4511)– Turma: 3ºano. Prof. Orientadora/UFRGS: Eunice A. Kindel ([kindel@poa.zunnet.com.br](mailto:kindel@poa.zunnet.com.br))



**Organização de Eventos:**

- Jan/2011 Curso de Férias PPGBCM Verão 2011 – Plantas: como funcionam? Planejamento e monitoria: 60h. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS.
- Jul/2010 Curso de Férias PPGBCM Inverno 2010 – Você conhece a célula? Planejamento e monitoria: 60h. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS.
- Jan/2010 Curso de Férias PPGBCM Verão 2010 – As Células. Planejamento e monitoria: 60h. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS.
- Out/2008 V Jornada Acadêmica da Biologia da UFRGS, JABUFRGS 2008. Planejamento e realização: 100h. ONG Igré e Instituto de Biologia, UFRGS.
- Nov/2007 IV Jornada Acadêmica da Biologia da UFRGS, IV JABURGS: Biologia: Educação Pesquisa e Mercado de Trabalho. Planejamento e realização: 72h. Pró-Reitoria de Extensão, Instituto de Biologia, UFRGS.

**Participação em outros Cursos e Congressos:**

- 14-17/set/2010 56° Congresso Brasileiro de Genética , 24h, Guarujá/SP.
- 30mai02jun/10 Simpósio de Criatividade, Interatividade e Difusão em Ciências, 25h, Projeto Jovens Talentos da Rede Pública, Olinda/PE.
- 28jun-03out/09 60° Congresso Nacional de Botânica, Feira de Santana/BA.
- 14-18/jul/2008 Curso 'Noções e Aplicações em Bioinformática', 40h, EMBRAPA Trigo, CNPq, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia e Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo/RS.
- 06/março /2008 Curso 'Elaboração de Vinhos e Derivados - Básico', 8h, EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS.
- 19-23/nov/2007 IV Jornada Acadêmica da Biologia da UFRGS, 17h, Porto Alegre/RS.
- 09- 14/set/2007 XI Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Gramado/RS.
- 04-08/dez/2006 Curso 'Radicais Livres: verdades, falácias, angústias e expectativas', 15h, Depto. Bioquímica/ICBS – UFRGS, Porto Alegre/RS.
- 25/setem/ 2006 I Mostra de Nanociência e Nanotecnologias da UFRGS, Porto Alegre/RS.
- 02/junho/ 2006 Curso 'O DNA na Escola', 7h, Faculdade de Educação/UFRGS, Porto Alegre/RS.
- 31out-04nov/05 IX Congresso Brasileiro de Parasitologia, Porto Alegre/RS.

- 03-05/nov/2004 I Jornada Acadêmica de Biologia da UFRGS, 12h, Porto Alegre/RS.
- 08-10/out/2004 II Encontro Gaúcho de Genética, Biologia Molecular e Saúde, 20h, Porto Alegre/RS.
- 07-10/set/2004 Curso 'Interferência por RNA: estratégias para inativação gênica em Mamíferos', 3h, *In*: 50º Congresso Brasileiro de Genética, Florianópolis/SC.
- 28/agosto/2003 Discussão sobre pesquisa utilizando células-tronco embrionárias humanas, 10h, Porto Alegre/RS.

### **Resumos publicados em Congressos anuais:**

\*FALAVIGNA, V.S., PERINI, P., REVERS, L.F. Identificação de genes MADS-box associados à dormência no genoma da macieira. *In*: 8º Encontro de Iniciação Científica e 4º Encontro de Pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho, 2010, Bento Gonçalves-RS. Resumos 8º Encontro de Iniciação Científica e 4º Encontro de Pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho, 2010.

\*GASPERIN, A.C., ANZANELLO, R., PERINI, P., REVERS, L.F., BELLO-FIALHO, F., SANTOS, H.P. Influência das gemas laterais sobre a gema apical em ramos de macieira d acv. Castel Gala. *In*: 8º Encontro de Iniciação Científica e 4º Encontro de Pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho, 2010, Bento Gonçalves-RS. Resumos 8º Encontro de Iniciação Científica e 4º Encontro de Pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho, 2010.

\*PELEGRINI *et al.* Curso de Férias PPGBCM: Ciência, Pesquisa e Educação. Apresentação oral: CAROLINA NÖR e PÂMELA PERINI: "Curso de Férias PPGBCM – 5ª edição, Verão 2011". *In*: XII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2010, Porto Alegre-RS.

\*PERINI, P., ALVES, T.L.S., SOARES, G.L.G. Similaridade química: mais uma evidência para o esquema filogenético da origem de Asteraceae. *In*: XVIII Jornadas de Jovenes Investigadores, Asociacion de Universidade Grupo Montevideo (AUGM), 2010, Argentina. (Apresentação oral e pôster)

\*PERINI, P., PASQUALI, G., MARGIS-PINHEIRO, M., REVERS, L.F. Seleção de genes-referência para estudos de expressão gênica utilizando PCR quantitativa em macieiras. *In*: XII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2010, Porto Alegre-RS. Livro de Resumos da XII Reunião Anual do PPGBCM do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2010.

\*ANZANELLO, R., PERINI, P., BELLO-FIALHO, F., SANTOS, H.P., REVERS, L.F., MARODIN, G.A.B., BERGAMASCHI, H. Temperatura e tempo de frio para indução e superação de dormência em gemas de macieira. *In*: XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2010, Natal-RN. Anais XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2010.

\*PERINI, P., PASQUALI, G., MARGIS-PINHEIRO, M., REVERS, L.F. Seleção de genes-referência para estudos de expressão gênica utilizando PCR quantitativa em macieiras. *In*: 56º Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá -SP. Anais 56º Congresso Brasileiro de Genética, 2010.

\*PERINI, P., PASQUALI, G., MARGIS-PINHEIRO, M., REVERS, L.F. Caracterização do perfil transcricional em gemas de cultivares de macieira contrastantes para a exigência de frio durante a dormência hiberna. *In*: XI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009, Porto Alegre-RS. Livro de Resumos da XI Reunião Anual do PPGBCM do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009.

\* PERINI, P., BEKER, S., ZANATTA, F., REVERS, L.F., SANTOS, H.P. Caracterização do nível de oxidação de glutatona durante a dormência hiberna em gemas de macieira. *In*: VI Encontro de Iniciação Científica e II Encontro de Pós-graduandos da EMBRAPA Uva e Vinho, 2008, Bento Gonçalves-RS. Resumos VI Encontro de Iniciação Científica e II Encontro de Pós-graduandos da EMBRAPA Uva e Vinho, 2008.

\*PERINI, P., FELIPPES, F.F., PASQUALI, G. Expressão da Cinamoil-CoA Redutase e Álcool Cinamílico Desidrogenase em plantas transgênicas de tabaco visando a alteração da composição e/ou teores de ligninas. *In*: XVII Salão de Iniciação Científica, 2005, Porto Alegre-RS. Resumos XVII Salão de Iniciação Científica PROPESQ/UFRGS, 2005. (Publicação atualizada da edição anterior em 2004.)

\*PERINI, P., FELIPPES, F.F., PASQUALI, G. Supressão da expressão da Cinamoil-CoA Redutase em plantas transgênicas de tabaco visando a alteração da composição e/ou teores de ligninas. *In*: 50º Congresso Brasileiro de Genética, 2004, Florianópolis-SC. Anais 50º Congresso Brasileiro de Genética, 2004.

\*FELIPPES, F.F., PERINI, P., PASQUALI, G. Supressão da expressão da Álcool Cinamílico Desidrogenase em plantas transgênicas de tabaco visando a alteração da composição e/ou teores de ligninas. *In*: 50º Congresso Brasileiro de Genética, 2004, Florianópolis-SC. Anais 50º Congresso Brasileiro de Genética, 2004.

### **Prêmios e Títulos:**

- 2008      Láurea Acadêmica, Bacharelado em Ciências Biológicas - Instituto de Biologia, UFRGS.
- 2007      Láurea Acadêmica, Licenciatura em Ciências Biológicas - Instituto de Biologia, UFRGS.

### **Aprovações em Concursos Públicos:**

- 2007      Classificação em 4º lugar para o cargo de Analista Pericial no Estado do Rio Grande do Sul, no V Concurso Público para provimento de cargos das carreiras de Analista e Técnico do Ministério Público da União, conforme Edital nº 18 de 23 de outubro de 2006.
- 2008      Classificação em 6º lugar no Concurso Público Federal de Provas e Títulos para provimento de cargo de Professor do Ensino Básico do quadro de pessoal do Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves, na área de Biologia, de acordo com o Edital Conjunto nº 13 de 15 de maio de 2008.