

Estudos de Expressão Gênica e Possibilidades de Aplicação no Melhoramento Genético de Pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch]



ISSN 1516-8840

Dezembro, 2013

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Clima Temperado

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Documentos 370

Estudos de Expressão Gênica e Possibilidades de Aplicação no Melhoramento Genético de Pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch]

Miriam Valli Büttow

Sandro Bonow

Embrapa Clima Temperado

Pelotas, RS

2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

BR 392 Km 78

Caixa Postal 403, CEP 96010-971- Pelotas, RS

Fone: (53) 3275-8100

Home page: www.cpact.embrapa.br

E-mail: cpact.sac@embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Ariano Martins de Magalhães Júnior*

Secretária - Executiva: *Bárbara Cosenza*

Membros: *Márcia Vizzotto, Ana Paula Schneid Afonso, Giovani Theisen, Luis Antônio Suíta de Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho.*

Suplentes: *Isabel Helena Vernetti Azambuja e Beatriz Marti Emygdio.*

Supervisão editorial: *Antônio Luiz Oliveira Heberlé*

Revisão de texto: *Ana Luíza B. Viegas*

Normalização bibliográfica: *Fábio Lima Cordeiro*

Editoração eletrônica: *Renata Abreu Serpa*

Autor(a) foto da capa: *Miriam Valli Büttow*

1ª edição (2013)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei N° 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Clima Temperado

Valli Büttow, Miriam

Estudos de expressão gênica e possibilidades de aplicação no melhoramento genético de pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch] / Miriam Valli Büttow e Sandro Bonow – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2013.

27p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 1516-8840, 370)

1. Biologia Molecular. 2. Expressão Gênica. 3. Melhoramento genético vegetal. 4. Pêssego. I. Bonow, Sandro. II. Título. III. Série.

CDD 572.865

© Embrapa 2013

Autores

Miriam Valli Büttow

Bióloga, D.Sc. em Genética e Biologia Molecular,
pesquisadora da Fepagro Serra do Nordeste,
Caxias do sul, RS, miriam-buttow@fepagro.
rs.gov.br

Sandro Bonow

Engenheiro-agrônomo, D.Sc em Agronomia,
pesquisador da Embrapa Clima Temperado,
Pelotas, RS, sandro.bonow@embrapa.br

Apresentação

O pessegueiro é uma das espécies frutíferas de maior relevância em regiões de clima temperado. O Estado do Rio Grande do Sul possui uma tradição de mais de 50 anos de pesquisa em melhoramento genético de pêsego, visando sempre cultivares mais adaptadas às condições edafoclimáticas e aos interesses dos consumidores.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de inúmeras técnicas de biologia molecular tem ajudado a enfrentar alguns dos maiores desafios desta cultura, como por exemplo maior qualidade de fruto, propriedades nutricionais e funcionais e durabilidade pós-colheita. Em locais com invernos amenos, no entanto, a produtividade pode ser ameaçada devido à necessidade que esta cultura tem de acumular horas de frio antes da floração.

Este documento revisa alguns aspectos básicos da biologia molecular e mostra como as pesquisas mais recentes nesta área podem ser importantes para o avanço no melhoramento genético de diversas espécies, especialmente o pessegueiro.

Clenio Nailto Pillon
Chefe-Geral
Embrapa Clima Temperado

Sumário

Introdução.....	9
Conceitos básicos de biologia molecular.....	11
Os ácidos nucleicos.....	11
Da sequência de DNA à síntese proteica.....	13
Estudos de expressão gênica em plantas.....	14
RT-qPCR: uma abordagem para estudos de expressão gênica.....	16
Oportunidades de pesquisa com expressão gênica em pessegueiro....	17
Considerações finais.....	19
Referências.....	19

Estudos de Expressão Gênica e Possibilidades de Aplicação no Melhoramento Genético de Pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch]

Miriam Valli Büttow
Sandro Bonow

Introdução

O ramo da Biologia conhecido como biologia molecular possui especial foco na estrutura e função dos ácidos nucleicos – DNA e RNA – e seus produtos de expressão, as proteínas. Nas últimas décadas, o advento das tecnologias de sequenciamento e o mapeamento completo do genoma de muitas espécies de plantas cultivadas, tornou o estudo dos genomas uma tarefa muito mais interessante e fortemente aplicável para o melhoramento.

A pesquisa em expressão gênica, por sua vez, é dedicada ao estudo de como, quando e quanto os genes, contidos no DNA, são expressos ao longo do desenvolvimento e em resposta a estresses bióticos e/ou abióticos. De modo geral, cada célula vegetal contém os mesmos genes. A diferença entre as células da folha em relação às presentes nas flores, por exemplo, é o nível de expressão destes genes. Simplificadamente, a informação que está contida nos genes (DNA) da planta é transcrita em RNA. O RNA, então, é traduzido em proteínas. Variações das quantidades de transcritos (informação contida no RNA) e do conteúdo de proteínas faz com que as células sejam, em última análise, diferentes.

Da mesma forma, cultivares de uma mesma espécie possuem diferenças na expressão de seus genes, sendo que a identificação de

genes de interesse diferencialmente expressos entre cultivares pode ser um caminho eficiente na seleção precoce de genótipos promissores para o melhoramento (LEIDA et al., 2012b). Nos estudos de expressão gênica, uma das técnicas que se destacam atualmente é a técnica RT-qPCR (do Inglês *quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction*). Esta técnica permite a identificação da presença de RNAs específicos de um gene, além da sua quantificação, possibilitando estudos de expressão diferencial, ou seja, quais genes apresentam alteração na expressão quando a planta está em determinada condição ou ambiente (BUSTIN et al., 2005).

As espécies frutíferas de clima temperado, como o pessegueiro, têm um período de dormência que permite que as plantas suportem temperaturas muito frias. O preparo das plantas para as condições desfavoráveis compreende o acúmulo de reservas, a perda de órgãos sensíveis (como as folhas) e o desenvolvimento de estruturas que protegem os meristemas. Portanto, no período de dormência acontecem vários eventos que iniciam pela indução e terminam na superação da dormência. A regularidade de baixas temperaturas durante o período hibernar é fundamental para a indução e adequada superação da dormência. O suprimento inadequado em frio para espécies de clima temperado determina a ocorrência de problemas relacionados à brotação, afetando o potencial produtivo destas espécies. Dentre as principais estratégias utilizadas para minimização dos problemas decorrentes do insuficiente acúmulo de frio, destaca-se a seleção e uso de cultivares de menor requerimento em frio (HAWERROTH et al., 2010). Erez (2000) enfatiza que o aspecto mais crítico no cultivo de espécies frutíferas de clima temperado em zonas com baixo acúmulo de frio hibernar é a superação da dormência de forma natural. Por outro lado, tanto a indução como a superação da dormência podem ter problemas. No primeiro caso, por ela acontecer tarde demais, podendo resultar em danos a órgãos que não estavam preparados. Já na superação da dormência, existe o risco de que esta ocorra demasiado cedo e as gemas (e ou flores) sejam danificadas por geadas. Os programas de melhoramento em pessegueiro têm

trabalhado intensamente no sentido de desenvolver cultivares com menor necessidade em frio e, portanto, melhor adaptadas a estas condições (HAWERROTH et al., 2010).

Entender os processos relacionados com a transcrição e expressão de genes pode abrir novos caminhos para a pesquisa de plantas em clima temperado, aumentando a precocidade e eficiência da escolha de genótipos e seleções em programas de melhoramento genético. Portanto, o objetivo deste trabalho foi reunir aspectos básicos da biologia molecular, importantes para a compreensão da técnica de RT-qPCR e seu potencial para estudar os principais alvos da pesquisa e melhoramento em pessegueiro.

Conceitos básicos de biologia molecular

Os ácidos nucleicos

Entre as características dos organismos vivos, a capacidade de autorreplacação é fundamental. A maneira como este processo ocorre, há muito tempo vem sendo objeto de estudo de inúmeros pesquisadores. Desde a descoberta do DNA por Friederich Miescher, em 1869, levou muito tempo até que suas funções primordiais de conterem e transmitir a informação genética fossem comprovadas por Herschey, em 1953. Ainda em 1953, a estrutura em dupla-hélice foi proposta por Watson e Crick e lançou as bases de como essa molécula poderia ser duplicada. No mesmo laboratório onde Miescher descobriu o DNA, outra substância muito semelhante, hoje conhecida como RNA, foi descrita por Hoppe-Seyler (ZAHA et al., 2013). O DNA (ácido desoxirribonucleico) e o RNA (ácido ribonucleico) constituem os ácidos nucleicos, macromoléculas de extrema importância biológica em todos os organismos vivos. As células recebem instruções sobre quais proteínas sintetizar e em que quantidade, a partir destas moléculas, responsáveis por estocar e transmitir a informação genética na célula. Essa informação é decifrada através do código genético, cuja tradução resulta na síntese

proteica. Portanto, conter a informação genética significa não somente armazenar e transmitir ao longo das gerações, mas expressar, ou seja, servir de molde para a síntese de RNAs e alguns desses serem traduzidos nas proteínas correspondentes (TURNER et al., 2004; ZAHA et al., 2013).

Em contraste com o DNA, diferentes tipos de RNA estão presentes na célula e desempenham funções específicas. Os RNAs são classificados de acordo com a sua localização e sua função na célula: O mRNA (RNA mensageiro) transfere a informação genética do DNA aos ribossomos, sítio da síntese de proteínas; o rRNA (RNA ribossomal) é o componente majoritário dos ribossomos e o tRNA (RNA transportador) carrega os resíduos de aminoácidos até os ribossomos para a síntese de proteínas (TURNER et al., 2004).

No início dos anos 1950, Francis Crick sugeriu que haveria um fluxo unidirecional de informação genética do DNA através do RNA para uma proteína, ou seja, “o DNA faz um RNA que faz uma proteína”. Esta sentença ficou conhecida como dogma central da biologia molecular. Atualmente se reconhece que a ampla confiança no dogma central é correta, embora existam várias modificações no esquema básico. A via primária permanece do DNA para o RNA para a proteína. Tanto nas células procarióticas quanto nas eucarióticas, o DNA é transcrito para uma molécula de mRNA e, então, a mensagem é traduzida em uma sequência de proteína conforme o código genético. Entretanto, existem algumas exceções a este esquema básico. Diversas classes de vírus contêm um genoma que consiste em uma molécula de RNA. Em retrovírus, por exemplo no HIV, a molécula unifilamentar de RNA é convertida em DNA de dupla hélice. Este processo é conhecido como transcrição reversa, e a enzima responsável - codificada no genoma viral, é chamada de transcriptase reversa. O uso de transcriptases reversas (RT) derivadas de vírus em inúmeras técnicas de laboratório revolucionou a biologia molecular (TURNER et al., 2004).

A síntese de DNA e RNA ocorre por processos semelhantes,

entretanto, a função biológica de cada um desses processos é bastante diferente. Uma sequência particular de DNA, codificadora de uma informação ou proteína, corresponde a um gene. Já o conjunto de genes de um organismo, o genoma, possui sempre a mesma função básica, que é de servir como repositório replicativo da informação codificada pelo DNA que o constitui. Enquanto a síntese de DNA deve ser precisa e uniforme, a transcrição espelha o estado fisiológico da célula e, portanto, é extremamente variável para atender às suas necessidades. Assim, a sequência de mRNA é alterada após ser transcrita do DNA, em um processo de edição do RNA, de modo que a sequência do DNA não é integralmente usada para codificar o produto proteico (TURNER et al., 2004).

Diversos avanços significativos têm sido obtidos através do isolamento, análise e síntese de sequências de DNA e de genes, e da introdução desses DNAs recombinantes em células vivas para o estudo da sua função e dos mecanismos que controlam sua expressão. Atualmente, os esforços estão voltados para o entendimento das relações entre ácidos nucleicos e proteínas que resultam em, virtualmente, todos os eventos genéticos na célula (TURNER et al., 2004; WANG et al., 2010; ARÚS et al., 2012).

Da sequência de DNA à síntese proteica

Os ácidos nucleicos possuem papel fundamental no armazenamento e transmissão da informação genética. O processo da cópia de regiões específicas de DNA (os genes) numa molécula de mRNA e a passagem da informação contida na sequência de nucleotídeos desse mRNA para uma sequência de aminoácidos, resulta na expressão dos genes contidos em determinado organismo, ou expressão gênica.

As moléculas de RNA são sintetizadas por um processo de transcrição, similar à replicação do DNA. A transcrição deve ser iniciada e terminada em pontos específicos da sequência do DNA, e a célula controla quando determinadas sequências devem ser transcritas e quanto RNA deve ser sintetizado. Nesse processo, uma das duas

fitas do DNA atua como modelo para que o pareamento de bases complementares possa acontecer. O mRNA, então transcrito, dirige a síntese da molécula proteica. Em uma determinada célula e em determinado momento, alguns genes são utilizados para transcrever RNA em grandes quantidades, enquanto outros podem ser pouco ou não são transcritos. A partir de um gene ativo, grandes quantidades de mRNAs podem ser sintetizados em cada célula. Além disso, cada molécula de mRNA pode ser traduzida em milhares de cópias de uma cadeia polipeptídica, isto é, a informação contida numa pequena região do DNA pode dirigir a síntese de milhares de cópias de uma proteína específica (ZAHA et al., 2013). Portanto, a transcrição representa a diversidade e a complexidade da expressão dos genes contidos em um determinado genoma. Este conjunto de transcritos de uma célula ou conjunto de células, incluindo mRNAs que codificam proteínas, e RNAs pequenos não codificantes, como RNA ribossomal e RNA transportador, formam o transcriptoma (TURNER et al., 2004).

As propriedades biológicas de cada tipo de célula são amplamente determinadas pelas proteínas expressas dentro dela. Este conjunto de proteínas expressas é importante para a arquitetura celular, para as atividades enzimáticas, as interações com o ambiente, e diversas outras propriedades fisiológicas. No entanto, em determinado momento da vida da célula, apenas uma fração dos RNAs e proteínas codificadas em seu genoma é expressa. Em momentos diferentes, o perfil dos produtos expressos pode diferir marcadamente, tanto em tipos de proteínas como em que níveis são expressas. A maioria da regulação gênica é tida como ocorrendo através da transcrição gênica. O mecanismo básico pelo qual a expressão gênica é regulada depende dos sinais moleculares de fora ou de dentro da célula, os quais levam à ligação de proteínas reguladoras a sítios específicos do DNA, e a ligação destas proteínas modula a taxa de transcrição (GRIFFITHS et al., 2008).

Estudos de expressão gênica em plantas

As plantas possuem a habilidade de alterar consideravelmente seus

padrões de expressão genética em resposta a alterações ambientais como temperatura, disponibilidade de água e ataque por patógenos (NICOT et al., 2005; WINFIELD et al., 2010). O ambiente é percebido pelas plantas através de um sinal particular, o qual pode ser ou não específico de algum tipo de estresse. Essa “pista” na transcrição de um sinal dentro da planta a leva a amplas mudanças no metabolismo celular, envolvendo mudanças na expressão de centenas de genes. Algumas vezes, estas alterações transcricionais são adaptações bem sucedidas que levam à tolerância, enquanto que em outras situações, a planta acaba falhando em se adaptar e é tida como suscetível à determinada condição. Um perfil de expressão pode, portanto, definir respostas sensíveis e tolerantes (HAZEN et al., 2003).

A análise do transcriptoma auxiliou a melhor compreensão das respostas das plantas a diferentes tipos de estresse e, através destes estudos, numerosos genes de resposta a estresse foram descobertos. A sobreposição de genes induzidos sob várias condições sugere que existam intersecções entre as vias de sinalização (NICOT et al., 2005).

O tempo também é outro fator crítico na regulação da transcrição. Alguns genes têm sua expressão aumentada em determinado período e depois continuam no mesmo nível, enquanto que outros são “ligados e desligados”. Em plantas de aveia estressadas por sal, foram descritos quatro estádios de mudança de expressão: resposta instantânea, resposta precoce, recuperação precoce e compensação do estresse. Neste caso, acessos suscetíveis obtiveram respostas similares aos acessos tolerantes, porém responderam de forma mais lenta. Portanto, aparentemente, a regulação rápida da transcrição foi responsável pela tolerância a sal nos genótipos estudados (KAWASAKI et al., 2001). Ainda, a descoberta de que existem mudanças de expressão gênica durante a aclimação no frio levou ao conhecimento detalhado de uma das mais bem compreendidas rotas metabólicas de respostas a estresses abióticos (HAZEN et al., 2003; WINFIELD et al., 2010). Da mesma forma, outros tipos de estresse podem ser explorados na busca por uma correlação entre a expressão gênica e os mecanismos de

tolerância e suscetibilidade em diferentes espécies e genótipos.

As mudanças no transcriptoma são, em grande parte, tecido-específicas. Esta é uma condição esperada, já que muitos tipos de estresse são também tecido-específicos. Raízes, por exemplo, percebem fontes de estresse provenientes do solo, enquanto que temperaturas extremas são percebidas pela biomassa acima do solo. Além disso, fisiologicamente, raízes e ramos respondem à seca de formas diferentes. As raízes podem continuar o alongamento, enquanto que o crescimento dos ramos pode ser completamente inibido. A consequência desta resposta diferencial é que as raízes podem buscar água em solo mais profundo, enquanto que os ramos sem crescimento conservam o consumo de água. Assim sendo, fica evidente que existem diferenças entre tecidos e órgãos em resposta a estresse (HAZEN et al., 2003).

Em muitas espécies arbóreas perenes, a superação da dormência responde ao acúmulo sazonal de horas de frio e diversos estudos recentes usaram abordagens globais a fim de analisar os mecanismos moleculares deste processo. Os perfis de expressão durante a indução, manutenção e superação da dormência foram realizados em espécies como *Populus tremula*, carvalho, framboesa, videira, pêssego e damasco. Estes estudos descreveram um conjunto inicial de genes candidatos envolvidos na indução de dormência por frio e luminosidade em espécies arbóreas (JIMÉNEZ et al., 2010). Em pêssego, alguns fatores de transcrição codificados por uma família de genes conhecida como *DORMANCY ASSOCIATED MADS-box (DAM)* estão relacionados com esta rota metabólica, porém outros elementos regulatórios ainda não foram identificados. Além disso, a regulação dos genes *DAM* ainda não é conhecida a nível molecular. A expressão de alguns genes desta família, relacionados com o ácido abscísico e estresse por seca, estão também correlacionados com o processo da dormência em cultivares de pêssego (LEIDA et al., 2012a).

O entendimento das respostas regulatórias das plantas aos diferentes

tipos de condições ambientais tem aplicação direta no melhoramento genético das plantas (HAZEN et al., 2003). Existe um grande potencial para melhorar a tolerância ao estresse através tanto da engenharia genética quanto do melhoramento convencional. Os estudos de perfis de transcrição podem aumentar o conhecimento de rotas metabólicas de resposta a estresse e fornecer novos caminhos para a avaliação e seleção de genótipos.

RT-qPCR: Uma abordagem para estudos de expressão gênica

A quantificação dos níveis de expressão gênica é um passo fundamental em, virtualmente, todos os aspectos da biologia molecular. Além disso, é particularmente importante quando genes que são expressos especificamente sob certas condições ambientais devem ser comparados. Entre as técnicas comuns para avaliar níveis de expressão gênica destacam-se a hibridização *Northernblot* e a PCR mediada por transcriptase reversa. Ambas as técnicas são práticas para a análise de pequenos conjuntos de genes e são complementadas pela análise de microarranjos, a qual é rotineiramente utilizada em perfis de expressão globais, em larga escala (HONG et al., 2008). Recentemente a RT-qPCR tem sido o método de escolha para medir os níveis de expressão em múltiplas amostras, envolvendo um limitado número de genes (BUSTIN et al., 2010). A técnica de RT-qPCR tornou-se extremamente útil para a detecção e quantificação dos níveis de transcrição do RNA mensageiro – mRNA de determinado gene de interesse, devido à sua alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, pela facilidade de dispensar o pós-processamento do PCR e permitir uma comparação direta entre RNAs que diferem muito em abundância. A base desta técnica reside no processo de transcrição reversa (RT) seguida da reação em cadeia da polimerase (PCR) com a incorporação de moléculas fluorescentes covalentemente ligadas ou não a nucleotídeos, as quais podem ser quantificadas durante a cinética da reação (em “tempo real”). Os produtos formados são monitorados a cada ciclo de reação, o que permite uma detecção rápida e específica dos produtos de amplificação. Esta técnica fornece uma acurada e sensível quantificação dos transcritos, mesmo em genes com níveis de

expressão muito baixos e atualmente é o método que apresenta maior sensibilidade e especificidade na análise de transcritos (GACHON et al., 2004; HONG et al., 2008).

Para quantificar a expressão gênica acuradamente, muitas variações experimentais devem ser levadas em conta: qualidade e quantidade do material inicial, presença de inibidores em diferentes materiais amostrais, desenho de *primers* (iniciadores), extração de RNA e eficiência de retrotranscrição. A seleção de um gene mais estável ou um conjunto de genes para serem usados como controle interno também é um passo crítico para controlar a variabilidade entre amostras para estudos de expressão gênica quantitativa com a técnica de RT-qPCR (TONG et al., 2009). Idealmente, o gene de referência e o gene alvo devem ter intervalos similares de expressão nas amostras utilizadas (VANDESOMPELE et al., 2002).

Desde então, foram estudados genes de referência para muitas culturas, como por exemplo arroz (JAIN et al., 2006), feijão (BORGES et al., 2012), ervilha (DIE et al., 2010), pêssego (TONG et al., 2009), algodão (ARTICO et al., 2010), entre outras. Estes estudos mostraram que muitas vezes não é possível encontrar um gene de referência que atinja todas as exigências de normalização, o que pode levar a erros significativos de interpretação dos resultados. Assim, atualmente é recomendado utilizar de dois a três genes de referência em cada estudo. Os genes mais comuns utilizados como referência são o 18S ribossomal, (18S rRNA), β -actina (ACT) e o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Ainda assim, a seleção adequada de genes de referência irá depender sempre da natureza e âmbito do experimento a ser realizado (HUGGETT et al., 2005; NICOT et al., 2005; TONG et al., 2009).

Oportunidades de pesquisa com expressão gênica em pessegueiro

O pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsch) é a espécie mais bem caracterizada geneticamente dentro da família Rosaceae. De relevante

importância econômica, é a terceira fruta de clima temperado em área cultivada. Algumas características a tornam interessantes como uma espécie modelo entre as espécies frutíferas arbóreas, como por exemplo o sistema de cruzamento autocompatível e um período juvenil relativamente curto (2 a 3 anos). Além disso, é uma espécie diploide com $n=8$ e um genoma pequeno, estimado em 0,61 pg de DNA por núcleo diploide e equivalente a cerca de 300 Mpb por genoma haploide (ARÚS et al., 2012).

No Brasil, os programas de melhoramento genético em pessegueiro têm trabalhado intensamente no sentido de desenvolver cultivares mais adaptadas às condições de inverno ameno, isto é, com mais baixa necessidade de frio (BYRNE, 2010). A Embrapa Clima Temperado possui uma longa tradição no melhoramento de pêssego, sendo que grande parte das variedades atualmente cultivadas são oriundas desta instituição (RASEIRA et al., 2008).

Com o sequenciamento completo do genoma do pessegueiro em 2010 (ARÚS et al., 2012) e a disponibilidade de um enorme número de sequências expressas (ESTs, do Inglês *expressed sequence tags*) em bancos de dados, foram impulsionadas várias oportunidades de estudos relacionados ao genoma e ao transcriptoma em *Prunus*. Alguns trabalhos em *Prunus* têm buscado testar genes candidatos envolvidos em diferentes rotas metabólicas de características de interesse agrônomo via estudos de ESTs (TITTARELLI et al., 2009; VIZOSO et al., 2009), porém, outras alternativas, como por exemplo, via estudos de sequências homólogas de espécies utilizadas como modelo deve ser considerada. Uma vez identificados os genes candidatos, esses podem ser validados via estudos de expressão gênica.

A grande maioria dos estudos de expressão gênica em pessegueiro busca genes associados à qualidade de frutos e durabilidade durante o armazenamento e transporte. Em muitas situações, o armazenamento refrigerado é utilizado como uma alternativa para desacelerar o amadurecimento e aumentar a durabilidade do fruto. No entanto,

este tipo de armazenamento pode ter efeitos negativos na qualidade de fruto, resultando em problemas como escurecimento e injúria mecânica. Neste sentido, pesquisas recentes buscam encontrar genes ou grupos de genes diferencialmente expressos em resposta a fatores de pós-colheita (VIZOSO et al., 2009). Durante o armazenamento refrigerado, os genes dos frutos são expressos diferencialmente e associados com a aclimação no frio (TITTARELLI et al., 2009). Outros trabalhos buscam em marcadores de sequências expressas genes envolvidos na qualidade de fruto e estes genes são validados através de análises de RT-qPCR (OGUNDIWIN et al., 2008).

Entre as características estudadas via expressão gênica em *Prunus*, não são encontrados na literatura estudos substanciais envolvendo a tolerância ao calor em pessegueiro (MARTÍNEZ-GÓMEZ et al., 2011). Isso é explicado por esse estresse ser um problema, ao menos até o momento, apenas para alguns países e regiões do mundo, incluindo o Brasil. Existem, no entanto, estudos que buscam relacionar a necessidade de horas de frio para superação da dormência com a expressão diferencial de genes. Um melhor conhecimento dos genes envolvidos na manutenção e superação da dormência pode fornecer ferramentas genéticas para o acesso precoce desta característica em programas de melhoramento genético. Estudos recentes sobre os aspectos moleculares da dormência forneceram uma descrição inicial de genes candidatos envolvidos na manutenção e superação da dormência de gemas em pessegueiro. Os resultados indicam que a análise da expressão gênica pode contribuir para estimar a necessidade de horas de frio para superação da dormência em novas cultivares (LEIDA et al., 2012b).

Considerações finais

O melhoramento genético tem alcançado um grande sucesso nas últimas décadas, através do melhoramento de características agrônômicas (produtividade, qualidade de fruto, resistência a insetos e doenças) por cerca de um século. O advento da era genômica abriu novas oportunidades, ajudando no melhoramento de cultivares com

técnicas moleculares e engenharia genética (ARÚS et al., 2012)

O contexto atual de, por um lado, uma maior demanda por alimentos funcionais e com qualidade nutritiva superior, e, por outro, a percepção do aumento da temperatura global nos últimos cem anos (ROOT, 2003), desafia a pesquisa em pessegueiro, em busca de genótipos superiores e bem adaptados a estas condições climáticas. Estes eventos, mais do que dificuldades, representam oportunidades para o desenvolvimento científico, tão importante para a cadeia produtiva do pêssego na região e no País.

Referências

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**, v. 10, n. 49, 2010.

ARÚS, P.; VERDE, I.; SOSINSKI, B.; ZHEBENTYAYEVA, T.; ABBOTT, A. G. The peach genome. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, n. 3, p. 531–547, 2012. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11295-012-0493-8>>. Acesso em: 23/11/2012.

BORGES, A.; TSAI, S. M.; CALDAS, D. G. G. Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 827–838, 2012.

BUSTIN, S. A.; BEAULIEU, J.-F.; HUGGETT, J.; et al. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. **BMC Molecular Biology**, v. 11, p. 74, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2955025&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 597–601, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956331>>. Acesso em: 5/11/2012.

BYRNE, D. H. Environment challenges of breeding peaches for low chill regions. In: HERTER, F. G.; LEITE, G. B.; RASEIRA, M. do C. B. (Eds.). **Proc. VIII Symposium of temperate zone fruits in the Tropics and Subtropics**. The Hage: ISHS, 2010. (Acta Horticulturae, 872). p. 129-138.

DIE, J. V.; ROMÁN, B.; NADAL, S.; GONZÁLEZ-VERDEJO, C. I. Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions. **Planta**, v. 232, p. 145–153, 2010.

EREZ, A. Bud dormancy: phenomenon, problems and solutions in the tropics and subtropics. In: EREZ, A. Ed. **Temperate fruit crops in warm climates**, 2000 p. 17-48.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 402, p. 1445–54, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15208338>>. Acesso em: 6/11/2012.

GRIFFITHS, A. J.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B. **Introdução à genética**. 9th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 2008.

HAWERROTH, F. J.; HERTER, F. G.; PETRI, J. L.; LEITE, G. B.; PEREIRA, J. F. M. **Dormência em frutíferas de clima temperado**. 1st ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Documentos, 2010.

HAZEN, S. P.; WU, Y.; KREPS, J. A. Gene expression profiling of plant responses to abiotic stress. **Funcional & Integrative Genomics**, v. 3, p. 105–111, 2003.

HONG, S.-Y.; SEO, P. J.; 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**, v. 8, p. 112, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2588586&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21/11/2012.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes And Immunity**, v. 6, n. 4, p. 279–84, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15815687>>. Acesso em: 31/10/2012.

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**, v. 345, p. 646–651, 2006.

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**, 2010.

KAWASAKI, S.; BORCHERT, C.; DEYHOLOS, M.; WANG, H.; BRAZILLE, S.; KAWAI, K.; GALBRAITH, D.; BOHNERT, H. J.. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. **The Plant Cell**, v. 13, n. 4, p. 889–905, 2001. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=135538&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

LEIDA, C.; CONESA, A.; LLACER, G.; BADENES, M. L.; RÍOS, G.
Histone modifications and expression of *DAM6* gene in peach are modulated during bud dormancy release in a cultivar- dependent manner. **New Phytologist**, v. 6, p. 67–80, 2012.

LEIDA, C.; ROMEU, J. F.; GARCÍA-BRUNTON, J.; RÍOS, G.; BADANES, M. L. Gene expression analysis of chilling requirements for flower bud break in peach. **Plant Breeding**, v. 131, n. 329, p. 334, 2012.

LLORENS, T. M.; BYRNE, M.; YATES, C. J.; NISTELBERGER, H. M.; COATES, D. J. Evaluating the influence of different aspects of habitat fragmentation on mating patterns and pollen dispersal in the bird-pollinated *Banksia sphaerocarpia* var. *caesia*. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 2, p. 314–28, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22151648>>. Acesso em: 27/3/2012.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, P.; CRISOSTO, C. H.; BONGHI, C.; RUBIO, M. New approaches to *Prunus* transcriptome analysis. **Genetica**, v. 139, n. 6, p. 755–69, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21584650>>. Acesso em: 29/10/2012.

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**, v. 56, n. 421, p. 2907–14, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16188960>>. Acesso em: 5/11/2012.

OGUNDIWIN, E. A.; MARTÍ, C.; FORMENT, J.; et al. Development of ChillPeach genomic tools and identification of cold-responsive genes in peach fruit. **Plant Molecular Biology**, v. 68, p. 379–397, 2008.

RASEIRA, M. C. B.; BARBOSA, W.; NAKASU, B. H.; PEREIRA, J. F. M. Pêssego. In: ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, A. G. da (Org.). **Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. v. 1, p. 519-529.

ROOT, T.L.; PRICE, J.T.; HALL, K.R.; SCHNEIDER, S.H.; ROSENZWEIG, C.; POUNDS, J.A. Fingerprints of global warming animals and plants. **Nature**, London, v.421, n. 6918, p. 57-60, 2003.

TITTARELLI, A.; SANTIAGO, M.; MORALES, A.; MEISEL, L. A.; SILVA, H. Isolation and functional characterization of cold-regulated promoters, by digitally identifying peach fruit cold-induced genes from a large EST dataset. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 121, p. 121, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2754992&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23/10/2012.

TONG, Z.; GAO, Z.; WANG, F. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 10, n. 71, 2009. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2199/10/71>>. Acesso em: 17/10/2012.

TURNER, P. C.; MCLENNAN, A. G.; BATES, A. D.; WHITE, M. R. H. **Biologia Molecular**. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 2004.

VANDESOMPELE, J.; PRETER, K. DE; POPPE, B.; et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT -PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 34.1–34.11, 2002.

VIZOSO, P.; MEISEL, L. A.; TITTARELLI, A.; et al. Comparative EST transcript profiling of peach fruits under different post-harvest conditions reveals candidate genes associated with peach fruit quality. **BMC Genomics**, v. 10, p. 423, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2748099&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22/10/2012.

WANG, L.; LI, P.; BRUTNELL, T. P. Exploring plant transcriptomes using ultra high-throughput sequencing. **Briefings in Functional Genomics**, v. 9, n. 2, p. 118–28, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20130067>>. Acesso em: 9/11/2012.

WINFIELD, M. O.; LU, C.; WILSON, I. D.; COGHILL, J. A; EDWARDS, K. J. Plant responses to cold: Transcriptome analysis of wheat. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 7, p. 749–71, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20561247>>. Acesso em: 1/11/2012.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 4th ed. Porto Alegre: Artmed, 416 p., 2013.

Embrapa

Clima Temperado

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

G O V E R N O F E D E R A L
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA

CGPE 10681