



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS**  
**CÂMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**MICAELE RODRIGUES DE SOUZA**

**FERRAMENTA (RGeasy®) DE ANÁLISE DE GENES DE REFERÊNCIA PARA  
ESTUDOS DE EXPRESSÃO VIA RT-qPCR**

**PALMAS-TO**

**2021**

MICAELE RODRIGUES DE SOUZA

**FERRAMENTA (RGeasy®) DE ANÁLISE DE GENES DE REFERÊNCIA PARA  
ESTUDOS DE EXPRESSÃO VIA RT-qPCR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agroenergia da Universidade Federal do Tocantins como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Agroenergia.

Orientador: Prof. Dr. Horllys Gomes Barreto  
Coorientador: Prof. Dr. Wosley da Costa Arruda

PALMAS-TO

2021

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

S729f Souza, Micaele Rodrigues de.

FERRAMENTA (RGeasy®) DE ANÁLISE DE GENES DE REFERÊNCIA  
PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO VIA RT-qPCR. / Micaele Rodrigues de  
Souza. – Palmas, TO, 2021.

61 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins  
– Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em  
Agroenergia, 2021.

Orientador: Horllys Gomes Barreto

Coorientador: Wosley Da Costa Arruda

1. RT-qPCR. 2. Análise de expressão gênica. 3. Genes de referência. 4.  
Biotecnologia. I. Título

**CDD 333.7**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer  
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.  
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184  
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

MICAELE RODRIGUES DE SOUZA

**FERRAMENTA (RGeasy®) DE ANÁLISE DE GENES DE REFERÊNCIA PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO VIA RT-qPCR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroenergia, avaliada para a obtenção do título de Mestre em Agroenergia e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca examinadora.

Data de Aprovação: 28/06/2021

Banca examinadora:

*Horllys Gomes Barreto*

---

Prof. Dr. Horllys Gomes Barreto, Orientador, UFT

*Flávia Lucila Tonani Siqueira*

---

Profa. Dra. Flávia Lucila Tonani Siqueira, Examinadora Interna, UFT

*Antonio Chalfun Junior*

---

Prof. Dr. Antonio Chalfun Junior, Examinador Externo, UFLA

Dedico...

Esta conquista, assim como tudo em minha vida, ao meu Deus, sem ELE nada seria possível e à minha família, que é o meu alicerce.

## AGRADECIMENTOS

Reconheço que, em um mundo de tantas dúvidas, aprendi na prática que Deus sempre será uma certeza. Por isso, sou imensamente grata, pois Ele não apenas me propiciou oportunidades, mas cuidou para que todo o processo valesse a pena e, de alguma forma, contribuísse para o meu crescimento intelectual e espiritual.

Com o tempo, aprendi a amar mais ainda quem sempre nos amou, pois é o tempo que nos ajuda a enxergar toda a entrega, cuidado, renúncia, amor e presença. Assim, sou profundamente agradecida aos meus pais, Adecildo e Omilda, por buscarem ser sempre meu abrigo ao longo de minha caminhada.

Meus pais, também, garantiram que a minha caminhada fosse regada por companheirismo, luz e alegria dando a mim, a meus irmãos, Walison, Pietro Miguel e Karen Dayane que multiplicou tudo pelo nascimento de meu sobrinho Vitor.

Aos meus queridos avós, tios/tias, padrinho/madrinha, primos/primas que de longe ou perto vibram com meu sucesso e oram pelos meus sonhos.

Aos meus amigos Karol e Allan pela amizade verdadeira e companheirismo constante mesmo a distância.

As minhas queridas amigas Rayssa e Carla Roberta pelo carinho, apoio e alegria desde a minha chegada em Palmas, assim como aos demais amigos conquistados por meio da comunidade adventista.

À Universidade Federal do Tocantins especialmente à coordenação do Mestrado em Agroenergia e ao corpo docente pela oportunidade de realizar o Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Horllys que, ao longo da jornada, desempenhou não apenas o papel de orientador, auxiliando-me, em toda a condução do meu trabalho, mas foi também amigo e família, juntamente com a Sol e o Baby. Obrigada pela acolhida em Palmas e por todos os momentos.

Ao professor Wosley pela coorientação e suporte no desenvolvimento do projeto.

Aos meus amigos da turma do mestrado, em especial, Biel, Rosi, Ana, JV e Junim pelas experiências trocadas, amizade e apoio.

À equipe do Laboratório de Análises Moleculares (LAM-UFT) pelas experiências e por possibilitar a realização, não apenas do meu projeto de dissertação, mas também o desenvolvimento de outros.

Ao Ivo Pontes da Ciência da computação e à equipe do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (LFMP-UFLA) pela parceria no desenvolvimento do *RGeasy*.

Aos membros da banca Dra. Flávia Lucila, Dr. Antônio Chalfun pela disposição e colaboração.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Manutenção e fluxo de trabalho do <i>RGeasy</i> . A partir do cadastro de espécies de animais, vegetais ou microrganismos, os pesquisadores depositam no <i>RGeasy</i> os dados, ou seja, valores de Cq's que são imediatamente verificados. Assim, os usuários podem rodar todas as combinações de condições/tratamentos possíveis para cada estudo. A nova combinação de tratamentos é ranqueada pelo RefFinder (XIE et al., 2012), e o <i>RGeasy</i> fornece, além do ranking com os genes de referência, um conjunto de <i>primers</i> validados para cada gene. ....	36
Figura 2- Arquitetura de camadas genéricas para uma aplicação web.....	37
Figura 3- Diagrama de caso de uso .....	39
Figura 4-Diagrama de classes.....	40
Figura 5-Diagrama Entidade-Relacionamento da base de dados. ....	41
Figura 6-Interface gráfica inicial da ferramenta <i>RGeasy</i> .....	42
Figura 7- Cadastro do usuário. ....	43
Figura 8-Login do usuário. ....	43
Figura 9-Categorias de espécies do <i>RGeasy</i> .....	43
Figura 10-Estudos de validação de genes de referência registrados no <i>RGeasy</i> . ....	44
Figura 11-Ranking gerado no <i>RGeasy</i> para as amostras de <i>C. canephora</i> analisadas por Fernandes-Brum et al. (2017).....	49
Figura 12-Informações gerais de cada gene disponibilizada pelo <i>RGeasy</i> . ....	54



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultado da busca de genes de referência, nas culturas de soja e milho, nas plataformas <i>Web of Science</i> e <i>Scopus</i> . .....	21
Tabela 2- Busca nas plataformas <i>Web of Science</i> e <i>Scopus</i> sobre validação de genes de referência para a cultura do cafeeiro. ....	46
Tabela 3 - Seleção de genes de referência, utilizando a ferramenta <i>RGeasy</i> , por meio de uma nova combinação de tratamentos ranqueados pela ferramenta RefFinder (XIE et al., 2012) do estudo desenvolvido por Freitas et al. (2017). ....	50
Tabela 4 - Seleção de genes de referência, utilizando a ferramenta <i>RGeasy</i> , por meio de uma nova combinação de tratamentos ranqueados pela ferramenta RefFinder (XIE et al., 2012) do estudo desenvolvido por Fernandes-Brum et al. (2017) para a espécie de <i>C. arabica</i> .51	
Tabela 5 - Seleção de genes de referência, utilizando a ferramenta <i>RGeasy</i> , por meio de uma nova combinação de tratamentos ranqueados pela ferramenta RefFinder (XIE et al., 2012) do estudo desenvolvido por Fernandes-Brum et al. (2017) para a espécie de <i>C. canephora</i> . ....	53
Tabela 6-Combinações de tratamentos/condições não exploradas nos artigos de validação de genes de referência para o gênero <i>Coffea</i> . ....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RGeasy	Reference Gene Easy
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa
RNA	Ácido ribonucleico
cDNA	DNA complementar
Cq	Ciclo de quantificação
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
QTLs	Características quantitativas
MIQE	The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
UML	Unified Modeling Language
MVC	Model-View-Controller
SQL	Structured Query Language
PHP	Preprocessed Hypertext
HTML	Hyper Text Markup Language
CSS	Cascading Style Sheets
UBQ	Ubiquitina
24S	Protein 24S
PP2A	Protein phosphatase 2A
EF1a	Elongation factor 1 $\alpha$
ACT	$\beta$ -actin
APRT	Adenine phosphoribosyl transferase
TUB	$\beta$ -tubulin
RPL39	60S ribosomal protein L39
AP47	Clathrin adaptor protein medium subunit
14.3.3	Protein 14.3.3
CYCL	Cyclophilin
APT1	Adenine phosphoribosyltransferase 1
ADH2	Class III alcohol dehydrogenase
RPL7	Ribosomal protein L7

PSAB

Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>15</b>
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1 RT-qPCR</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2 Genes de referência</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3 Ferramentas para a análise de genes de referência</b> .....	<b>18</b>
3.3.1 geNorm .....	18
3.3.2 NormFinder .....	19
3.3.3 Bestkeeper .....	19
3.3.4 Delta-Ct .....	20
3.3.5 RefFinder .....	20
<b>3.4 Estudos de expressão gênica em culturas agroenergéticas</b> .....	<b>20</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>23</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>24</b>
<b>ARTIGO 1</b> .....	<b>32</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>33</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>34</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
<b>2.1 Plataforma Web</b> .....	<b>37</b>
2.1.1 Arquitetura do Sistema .....	37
2.1.2 Linguagens de Programação e Marcação .....	38
2.1.2.1 HTML e CSS .....	38
2.1.2.2 JavaScript .....	38
<b>2.2 Testes (conjuntos de dados)</b> .....	<b>41</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1 Interface gráfica</b> .....	<b>42</b>
<b>3.2 Testes (conjuntos de dados)</b> .....	<b>45</b>
<b>3.3 Estudo de caso</b> .....	<b>48</b>
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	<b>54</b>

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>
<b>APENDICE .....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa (RT-qPCR) é uma técnica versátil e amplamente utilizada nas diferentes áreas, desde a agricultura até a medicina, pois permite a amplificação de trechos do material genético de qualquer organismo alvo, o que possibilita o diagnóstico de doenças (LIU et al., 2019; PARK et al., 2019; SANTOS-FERREIRA et al., 2020), a identificação de espécies (GHAJARBEYGI et al., 2018; FRÁŇOVÁ; PRIBYLOVA; KOLONIUK, 2019), a detecção de mutações (PAPIZH et al., 2019) e o estudo de expressão gênica (HNIT et al., 2020; LIN et al., 2020; SATHEESAN et al., 2020; ZHANG et al., 2020a).

Estudos de expressão gênica têm sido extensivamente empregados na caracterização de genes, no intuito de se entender mecanismos moleculares, envolvidos em respostas fisiológicas e subsidiar estudos como os de transformação genética (DENG et al., 2019; KIM et al., 2019; WANG et al., 2019a). Entretanto a confiabilidade dos dados de expressão gênica, provenientes da técnica de RT-qPCR, pode ser afetada diretamente por fatores, como a integridade e pureza do RNA a ser utilizado, a qualidade do cDNA, eficiência dos *primers* e a seleção adequada de genes de referência (DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010).

Quanto à seleção de genes de referência, são comumente utilizados como controles internos, por meio dos quais é feita a normalização dos dados de expressão gênica (DOS SANTOS et al., 2020). Contudo é essencial que os genes propostos, como genes de referência, sejam validados, experimentalmente, atestando assim a estabilidade de cada gene de referência (BUSTIN et al., 2009; VANDESOMPELE; KUBISTA; PFAFFL, 2009).

Dessa maneira, diferentes ferramentas já foram desenvolvidas para identificar o gene mais estável e, em consequência, o ideal para ser aplicado como gene de referência em estudos de expressão gênica (SONG et al., 2012; ROBLEDO et al., 2014; MARCELINO-GUIMARÃES et al., 2018).

As ferramentas mais frequentemente empregadas são: o *GeNorm* que calcula a estabilidade da expressão de genes de referência, a partir da expressão relativa, que é calculada com base nos valores de Cq (Ciclo de quantificação). O valor de estabilidade é definido como “M”, que é inversamente proporcional à estabilidade do gene avaliado (VANDENSOMPELE et al., 2002); *NormFinder* utiliza a expressão relativa, assim como *geNorm* e é baseado, em um modelo matemático de expressão gênica, que possibilita estimar a variação geral dos genes candidatos a genes de referência, como também a variação entre os subgrupos amostrais do conjunto de amostras (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTTOFT, 2004); *BestKeeper* emprega os

dados de Cq e calcula a estabilidade, por meio de correlações por pares, determinando a expressão gênica de até dez candidatos e os combina com um índice (PFAFFL et al., 2004); o *delta-Ct* comparativo determina a estabilidade de cada gene, por meio do desvio-padrão do *delta-Ct*, em que o aumento do desvio indica um aumento na variabilidade (SILVER et al., 2006) e, por fim, o *RefFinder* classifica os genes de referência por meio da integração de todos os programas computacionais anteriormente citados (XIE et al., 2012).

Como observado, todas as ferramentas baseiam suas análises de estabilidade nos valores de Cq's. Contudo nem sempre essas informações são disponibilizadas nos artigos, o que dificulta a escolha do melhor gene de referência para ser aplicado em estudos de expressão gênica.

Assim, diante da importância da validação de genes de referência ao sucesso da técnica de RT-qPCR, o objetivo deste trabalho é resolver a problemática, por meio da ferramenta *RGeasy*, que também aplicará os valores de Cq's no cálculo de estabilidade. Entretanto permitirá que os pesquisadores que desenvolvem estudos de validação de genes de referência forneçam a essa ferramenta informações ausentes em seus artigos, como valores de Cq's, possibilitando a classificação de genes de referências, para diferentes combinações de condições, tecidos e espécies, muitas vezes, não abordados no trabalho publicado, o que resultará em maior alcance de divulgação do estudo feito pelos pesquisadores e, em decorrência, maior número de citações.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma ferramenta (*RGeasy*®) de seleção de genes de referência para estudos de expressão gênica por RT-qPCR.

### 2.2 Objetivos específicos

- Validar genes de referência, por meio de novas combinações de condições e tratamentos, para o desenvolvimento de estudos de expressão gênica via RT-qPCR.
- Disponibilizar aos usuários os conjuntos de *primers* com os valores de coeficiente de correlação ( $R^2$ ), eficiência ( $e^*$ ), número de acesso e o banco em que a sequência foi selecionada para as análises de expressão gênica via RT-qPCR.



### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 RT-qPCR

A técnica qPCR (Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa) surgiu, a partir da técnica de PCR convencional, diferenciando-se principalmente desta por possibilitar o monitoramento da amplificação do DNA ou cDNA (DNA complementar), em tempo real, em razão da detecção da fluorescência emitida pela amostra, pela adição na reação de compostos químicos fluorescentes (MAGALHÃES et al., 2018). No caso do uso da RT-qPCR, indica-se que, antes do processo de amplificação, houve a etapa de transcrição reversa, que tem por intuito converter o RNA em dupla fita, sendo denominado de DNA complementar (cDNA) (BUSTIN et al., 2009).

Alguns autores consideram que a primeira PCR em tempo real, foi publicada em 1993, sendo denominada, na época, de “análise cinética da PCR” (HIGUCHI et al., 1993). Contudo o brometo de etídio que era utilizado para detectar e amplificar as sequências contribuía para menor especificidade da técnica (VIEIRA; PEREIRA, 2018). Então, em 1996, foi publicado um trabalho que relatava sobre o uso de um novo corante fluorogênico intercalante de DNA, o SYBR Green-1, que apresentava maior especificidade por detectar quantidades menores de DNA (BECKER et al., 1996), favorecendo a ampla aplicação da técnica.

Desde então, o uso da técnica tem proporcionado grandes contribuições à sociedade, com destaque para algumas áreas, como na Medicina, na Agricultura, na Pecuária e na Indústria.

Na área da saúde, é feito, por exemplo, o diagnóstico de doenças, como: Febre amarela (SICONELLI et al, 2019); Dengue e Zika (OU et al., 2020); Chikungunya (THIRION et al., 2019) e a COVID-19, considerada uma pandemia global, que ocasionou 2.965.707 mortes até a segunda semana de abril de 2021 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). O diagnóstico das doenças facilita o gerenciamento do surto, sendo fundamental para a prevenção e controle da pandemia (GAO, 2020).

Na agricultura, as *commodities* agrícolas, como soja, milho, café, algodão e cana-de-açúcar, também são alvos constantes de estudos envolvendo a técnica de RT-qPCR (FREITAS et al., 2019; LIANG; MA; LI, 2020; OSTROWSKI et al., 2020; RIAZ et al., 2020), no intuito de estudar o padrão de expressão gênica e, posteriormente, desenvolver cultivares com alto valor agregado melhorando características, como a resistência a doenças (MUSHTAQ et al., 2018; PARISH et al., 2019), pragas (KHAN et al., 2018) e herbicidas (KHAN et al., 2019).

Na pecuária também é frequente a aplicação da técnica para a identificação de potenciais biomarcadores de tecidos, que são importantes a fim de melhorar a produtividade das espécies (IOLANNIDIS; DONADEU, 2018), detecção de patógenos (KASI et al., 2020) e identificação e validação de características quantitativas (QTLs) (DRAG et al., 2019).

Já quanto ao setor industrial, essa técnica é comumente utilizada no controle de qualidade (SONG et al., 2019), como também em estudos sobre a biossíntese de substâncias de interesse industrial, como é o caso da bixina, um dos corantes mais utilizados na indústria de alimentos (CARBALLO-UICAB et al., 2019).

### 3.2 Genes de referência

Os genes de referência são sequências que apresentam níveis de expressão constantes (MARCELINO-GUIMARÃES et al., 2018), sendo, dessa maneira, utilizados como controles internos, possibilitando a normalização dos dados (DOS SANTOS et al., 2020).

Ao analisar diferentes tipos de tecidos ou estádios de desenvolvimento e variações nas condições experimentais, podem gerar erros na quantificação e, conseqüentemente, reduzir a confiabilidade dos dados experimentais (MARCELINO-GUIMARÃES et al., 2018), o que torna essencial o uso de normalizadores. A normalização além de controlar as variações citadas anteriormente, atua também sobre as variações no rendimento da extração, possibilitando a comparação entre as amostras (BUSTIN et al., 2009).

Os genes de referência mais usuais são genes envolvidos no metabolismo basal, sendo chamados de *Housekeeping genes*, como, por exemplo, *RNA Ribossomal 18S (Rrna 18S)*,  *$\alpha$ -tubulina (TUBA)*,  *$\beta$ -actina (ACTINA)*, *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)* e outros. Contudo, como esses genes estão envolvidos em outros processos, também, não é possível garantir a sua funcionalidade e estabilidade em todas as condições (MARCELINO-GUIMARÃES et al., 2018).

Por isso, torna-se necessária a validação dos genes propostos como genes de referência, comprovando que atendem a critérios como o nível de expressão não ser alterado por fatores experimentais, ou seja, apresentar estabilidade e menor variabilidade de expressão possível. De acordo com as “The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE)”, devem ser empregados no mínimo dois genes de referência, nos estudos de expressão gênica, para que se possa garantir a confiabilidade e reprodutibilidade das informações obtidas (BUSTIN et al., 2009; MARCELINO-GUIMARÃES et al., 2018).

Assim, vários estudos de validação de genes de referência foram realizados em microrganismos (LIU et al., 2018; PENG et al., 2018), vegetais (CAO et al., 2019; HOSSAIN et al., 2019; WANG et al., 2019b) e animais (GROMBONI et al., 2020; MEZERA et al., 2020), visando determinar os genes mais adequados às diferentes condições e, por conseguinte, diferentes ferramentas já foram desenvolvidas para auxiliar nessa validação.

### **3.3 Ferramentas para a análise de genes de referência**

#### **3.3.1 geNorm**

O *GeNorm* foi proposto por Vandesomepele et al. (2002), sendo uma das primeiras ferramentas desenvolvidas para a validação de genes de referência. A validação da ferramenta foi realizada, por meio de uma análise de expressão de dez genes pertencentes a diferentes classes funcionais e de abundância, em vários tecidos humanos, sendo determinada a sua expressão e estabilidade em treze diferentes tecidos (VANDESOMPELE et al., 2002; VANDESOMPELE; KUBISTA; PFAFFL, 2009).

O *GeNorm* calcula a estabilidade da expressão de genes de referência, a partir da expressão relativa, que é calculada com base nos valores de Cq's, cuja amostra com maior nível de expressão (menor Cq) recebe o valor 1 e os demais valores são obtidos a partir da sua subtração. Dessa maneira, com base nesses dados, é feita então uma variação pareada com todos os genes, ou seja, é analisada a variação de expressão a cada dois genes, fazendo todas as combinações possíveis, obtendo-se assim o desvio-padrão para cada par de genes. O valor de estabilidade gênica é definido como "M", que é inversamente proporcional à estabilidade do gene avaliado. Assim, quanto menor o valor de "M" mais estável é a expressão gênica e, a partir daí, é realizada a exclusão gradual de cada um dos genes com maiores valores para "M", permitindo, dessa maneira, a elaboração de um ranking com todos os genes testados (VANDESOMPELE et al., 2002; VANDESOMPELE; KUBISTA; PFAFFL, 2009).

A ferramenta determina também o número mínimo de genes de referência necessários para se obter um fator de normalização confiável que é calculado para cada amostra. O fator de normalização se baseia em média geométrica e o valor de corte da variação em pares proposto é 0,15. Dessa maneira, ao adicionar cada gene, se o valor da variação for superior a 0,15, significa que ele tem um efeito significativo e, por isso, deve ser incluído no cálculo de fator de normalização. Assim, a ferramenta disponibiliza o gene mais adequado, como também o par de

genes com menores variações (VANDESOMPELE et al., 2002; VANDESOMPELE; KUBISTA; PFAFFL, 2009).

### 3.3.2 NormFinder

O *NormFinder* foi desenvolvido por Andersen, Jensen e Ørntoft (2004) e validado por meio de um experimento de RT-qPCR, realizado com amostras de pacientes com câncer de cólon e bexiga. Assim como o *geNorm*, são utilizados, nessa ferramenta, os dados de expressão relativa obtidos pelo Cq.

O *NormFinder* calcula a variação de expressão intra e intergrupos, como também a estabilidade dos genes, dispondo-os em ordem decrescente. Ao estimar a variação de expressão intergrupos, é possível selecionar os genes mais adequados e, por meio da variação intragrupos, é possível identificar o número de genes que devem ser excluídos. A determinação da quantidade de genes a ser empregada é realizada quando a adição de um novo gene resulta em uma redução muito pequena na média das estimativas de variância genética (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004).

### 3.3.3 Bestkeeper

O *Bestkeeper* foi proposto por PFAFFL et al. (2004), por meio de um experimento de RT-qPCR, com amostras de corpos lúteos de bovinos. A ferramenta é baseada no Excel no qual os dados utilizados são os valores de Cq's. O desvio-padrão e o coeficiente de variação são calculados, por meio dos quais são determinados os genes mais estáveis, pois, a partir do desvio-padrão e coeficiente de variação, é definida a variação de expressão dos genes que é empregada, na análise de correlação pareada entre os genes de referência e o índice, que é feito por meio das médias geométricas dos valores de Cq's. Quanto menor o desvio-padrão, mais estável é o gene, e o limite determinado ao desvio-padrão é  $<1$ , qualquer gene com um valor superior a isso pode ser considerado inconsistente.

Nessa ferramenta, é possível analisar até dez genes de referência junto com dez genes-alvo em até cem amostras biológicas. Além disso, o conjunto de dados pode ser exportado para outras ferramentas diferentes dos outros softwares aqui apresentados (PFAFFL et al., 2004).

### 3.3.4 Delta-Ct

A ferramenta *Delta-Ct* foi proposta pelo Silver et al. (2006) que utilizou no experimento de RT-qPCR, amostras de reticulócitos, o que significa o uso de uma quantidade de material bem pequena, pois o RNA obtido das amostras de paciente são quantidades mínimas, impossibilitando assim o uso dos demais softwares aqui mencionados, pelo fato de que à análise de expressão que envolve a padronização do mRNA inicial, é adicionada uma quantidade constante de RNA a cada reação de transcrição reversa.

Por isso, foi proposta a validação dos genes de referência, por meio do *Delta-Ct*, que é semelhante ao desenvolvido por Vandesompele et al. (2002), visto que emprega variação pareada, porém não exige a quantificação precisa do RNA utilizado inicialmente. Esse método se baseia na comparação dos valores de *Delta-Ct*, a cada dois genes em diferentes amostras. Se ambos os genes apresentaram constância nos valores nas diferentes amostras, significa que ambos são expressos de maneira estável. Entretanto, se o *Delta-Ct* oscilar, indica instabilidade na expressão de um ou em ambos; sendo adicionado aos demais genes e a comparação por pares realizada, faz todas as combinações possíveis (SILVER et al., 2006).

### 3.3.5 RefFinder

O *RefFinder* foi desenvolvido por Xie et al. (2012) juntamente com o software *miRDeepFinder* que tem por intuito identificar e analisar a função de microRNAs de plantas. Assim, o *RefFinder* foi proposto para avaliar genes de referência à análise de expressão, incluindo os microRNAs.

Na busca de se escolher de fato o melhor gene de referência, empregando tudo que os demais softwares aqui citados têm a oferecer, o *RefFinder* integra as quatro ferramentas, utiliza os resultados dos quatro algoritmos e indica o melhor gene de referência. Os dados que são utilizados no *RefFinder* são também os dados de Cq. Ao final, a ferramenta disponibiliza um ranking com os genes, segundo cada algoritmo e, a partir desses dados, propõe um ranking geral (XIE et al., 2012).

## 3.4 Estudos de expressão gênica em culturas agroenergéticas

Na atualidade, as principais culturas empregadas à produção de biodiesel e etanol mundialmente, são as culturas de soja (CONAB, 2019) e milho (VIDAL, 2020),

respectivamente. Visando ao melhoramento genético dessas culturas, é comum a realização de estudos de expressão gênica por RT-qPCR, com o objetivo de compreender melhor os mecanismos moleculares que controlam seus diferentes aspectos de crescimento e desenvolvimento.

Como a normalização de dados, por meio de genes de referência, em estudos de expressão gênica é indispensável, o desenvolvimento de estudos que validem esses genes é essencial. Exemplo disso são os resultados obtidos, a partir de uma busca exclusiva sobre a validação de genes de referência, nas plataformas *Web of Science* e *Scopus*, sendo possível encontrar 14 artigos para soja e quatro artigos para o milho no intervalo de tempo de 2008 a 2020 (Tabela 1).

Tabela 1- Resultado da busca de genes de referência, nas culturas de soja e milho, nas plataformas *Web of Science* e *Scopus*.

<b>Artigo</b>	<b>Cultura</b>	<b>Autor</b>
Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR	Soja	Jian et al., 2008
Identification of Four Soybean Reference Genes for Gene Expression Normalization	Soja	Libault et al., 2008
Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR	Soja	Hu et al., 2009
The use of microRNAs as reference genes for quantitative polymerase chain reaction in soybean	Soja	Kulcheski et al., 2010
Identification of reference genes for expression analysis by real-time quantitative PCR in drought-stressed soybean	Soja	Stolf-Moreira et al., 2011
Validation of reference genes for real-time quantitative PCR normalization in soybean developmental and germinating seeds	Soja	Li et al., 2012

---

Expression Stabilities of Candidate Reference Genes for RT-qPCR under Different Stress Conditions in Soybean	Soja	Ma et al., 2013
Reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in soybean plants under hypoxic conditions	Soja	Nakayama et al., 2014
A high efficient protocol for soybean root transformation by <i>Agrobacterium rhizogenes</i> and most stable reference genes for RT-qPCR analysis	Soja	Kuma et al., 2015
Reference Genes in the Pathosystem <i>Phakopsora pachyrhizi</i> /Soybean Suitable for Normalization in Transcript Profiling	Soja	Hirschburger et al., 2015
Normalization for Relative Quantification of mRNA and microRNA in Soybean Exposed to Various Abiotic Stresses	Soja	Liu et al., 2016
Stability evaluation of reference genes for gene expression analysis by RT-qPCR in soybean under different conditions	Soja	Wan et al., 2017
Validation of Internal Reference Genes for Accurate Gene Expression Analysis in Soybean Roots Interacted with <i>Heterodera glycines</i> and <i>Bacillus megaterium</i>	Soja	Chen et al., 2019
Screening and validation of reference genes for real-time quantitative PCR in soybean	Soja	Zhang et al., 2020b
Evaluating precision and accuracy when quantifying different endogenous control reference genes in maize using real-time PCR	Milho	Scholdberg et al., 2009
Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize	Milho	Manoli et al., 2012

---

Selection of reliable reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in maize grains	Milho	Galli et al., 2013
Validation of potential reference genes for qPCR in maize across abiotic stresses, hormone treatments, and tissue types	Milho	Lin et al., 2014

---

Fonte: Dados da pesquisa.

Estudos de validação de genes de referência são também realizados para outras culturas agroenergéticas, como: cana-de-açúcar (YANG et al., 2016), trigo (MU et al., 2019), mandioca (HU et al., 2016), batata-doce (GUOLIANG et al., 2020), colza (MACHADO et al., 2015 ) e dendê (CHAN et al., 2014).

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A RT-qPCR é extremamente difundida, nos mais variados setores, contudo a confiabilidade dos dados provenientes da técnica, para a análise de expressão gênica, pode ser afetada por diferentes fatores, entre eles, está a seleção adequada de genes de referência, que são usados para normalização dos dados. Para minimizar os erros atribuídos à seleção inadequada dos genes de referência, diversas ferramentas foram desenvolvidas. Entretanto ainda há dificuldades durante o processo de escolha do gene ideal. Diante disso, percebe-se a necessidade de uma ferramenta que facilite e ainda garanta a qualidade dos genes escolhidos.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, Claus Lindbjerg; JENSEN, Jens Ledet; ØRNTTOFT, Torben Falck. 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**, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.
- BECKER, Andreas et al. A quantitative method of determining initial amounts of DNA by polymerase chain reaction cycle titration using digital imaging and a novel DNA stain. **Analytical biochemistry**, v. 237, n. 2, p. 204-207, 1996.
- BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- CAO, Aiping et al. Screening the reference genes for quantitative gene expression by RT-qPCR during SE initial dedifferentiation in four *Gossypium hirsutum* cultivars that have different SE capability. **Genes**, v. 10, n. 7, p. 497, 2019.
- CARBALLO-UICAB, Victor Manuel et al. Isolation and functional characterization of two dioxygenases putatively involved in bixin biosynthesis in annatto (*Bixa orellana* L.). **PeerJ**, v. 7, p. e7064, 2019.
- CHAN, Pek-Lan et al. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR in oil palm elite planting materials propagated by tissue culture. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99774, 2014.
- CHAPARRO-ENCINAS, L. A. et al. A modified CTAB and Trizol® protocol for high-quality RNA extraction from whole wheat seedlings, including rhizosphere. **Cereal Research Communications**, p. 1-8, 2020.
- CHEN, JingSheng et al. Validation of internal reference genes for accurate gene expression analysis in soybean roots interacted with *Heterodera glycines* and *Bacillus megaterium*. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 21, n. 5, p. 1024-1030, 2019.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Perspectivas para a agropecuária**. Brasília, v.7, p. 1-100, out. 2019. ISSN 2318-3241.
- DENG, Shixin et al. De novo transcriptome sequencing and gene expression profiling of *Magnolia wufengensis* in response to cold stress. **BMC plant biology**, v. 19, n. 1, p. 321, 2019.

DERVEAUX, Stefaan; VANDESOMPELE, Jo; HELLEMANS, Jan. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 227-230, 2010.

DOS SANTOS, Clesivan Pereira et al. Identification and evaluation of reference genes for reliable normalization of real-time quantitative PCR data in acerola fruit, leaf, and flower. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 2, p. 953-965, 2020.

DRAG, Markus H. et al. Characterization of eQTLs associated with androstenone by RNA sequencing in porcine testis. **Physiological genomics**, v. 51, n. 10, p. 488-499, 2019.

FRÁNOVÁ, Jana; PŘIBYLOVÁ, Jaroslava; KOLONIUK, Igor. Molecular and biological characterization of a new strawberry cytorhabdovirus. **Viruses**, v. 11, n. 11, p. 982, 2019.

FREITAS, Natália Chagas et al. In silico and in vivo analysis of ABI3 and VAL2 genes during somatic embryogenesis of *Coffea arabica*: competence acquisition and developmental marker genes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 137, n. 3, p. 599-611, 2019.

GALLI, Vanessa et al. Selection of reliable reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in maize grains. **Plant cell reports**, v. 32, n. 12, p. 1869-1877, 2013.

GANDHI, Vaibhav; O'BRIEN, Mara H.; YADAV, Sumit. High-Quality and High-Yield RNA Extraction Method From Whole Human Saliva. **Biomarker Insights**, v. 15, p. 1177271920929705, 2020.

GAO, Z. C. Efficient management of novel coronavirus pneumonia by efficient prevention and control in scientific manner. **Zhonghua jie he he hu xi za zhi= Zhonghua jiehe he huxi zazhi= Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases**, v. 43, p. E001-E001, 2020.

GHAJARBEYGI, P. et al. Qualitative investigation of meat species in meat products by real time polymerase chain reaction. **Journal of food safety**, v. 38, n. 6, p. e12528, 2018.

GROMBONI, Juliana Gracielle Gonzaga et al. Influence of heat stress on reference genes stability in heart and liver of two chickens genotypes. **Plos one**, v. 15, n. 2, p. e0228314, 2020.

GUOLIANG, Li et al. Selection of suitable reference genes for RT-qPCR normalisation in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) under different stresses. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, p. 1-11, 2020.

HIGUCHI, Russell et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Bio/technology**, v. 11, n. 9, p. 1026, 1993.

HIRSCHBURGER, Daniela et al. Reference genes in the pathosystem *Phakopsora pachyrhizi*/soybean suitable for normalization in transcript profiling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 23057-23075, 2015.

HNIT, Su Su Thae et al. Transcriptional regulation of G2/M regulatory proteins and perturbation of G2/M Cell cycle transition by a traditional Chinese medicine recipe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 251, p. 112526, 2020.

HOSSAIN, Md Sabbir et al. Identification and validation of reference genes for real-time quantitative RT-PCR analysis in jute. **BMC molecular biology**, v. 20, n. 1, p. 13, 2019.

HU, Ruibo et al. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC molecular biology**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2009.

HU, Meizhen et al. Validation of reference genes for relative quantitative gene expression studies in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by using quantitative real-time PCR. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 680, 2016.

IOANNIDIS, Jason; DONADEU, F. Xavier. Comprehensive analysis of blood cells and plasma identifies tissue-specific miRNAs as potential novel circulating biomarkers in cattle. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 243, 2018.

JIAN, Bo et al. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. **BMC molecular biology**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2008.

KASI, Khushal Khan et al. Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in ticks collected from livestock in Balochistan, Pakistan. **Transboundary and Emerging Diseases**, 2020.

KHAN, Arif M. et al. Evaluation of potential RNA-interference-target genes to control cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). **Insect science**, v. 25, n. 5, p. 778-786, 2018.

KHAN, Muhammad Fahad et al. Genetic modification of *Saccharum officinarum* for herbicide tolerance. **Cytology and Genetics**, v. 53, n. 3, p. 239-249, 2019.

KIM, Ah Young et al. The promoter of tomato HISTIDINE DECARBOXYLASE A is fruit-specific, and its expression is stably maintained in fruits during ripening. **Plant Biotechnology Reports**, v. 13, n. 1, p. 43-50, 2019.

KULCHESKI, Franceli Rodrigues et al. The use of microRNAs as reference genes for quantitative polymerase chain reaction in soybean. **Analytical biochemistry**, v. 406, n. 2, p. 185-192, 2010.

KUMA, K. M. et al. A high efficient protocol for soybean root transformation by *Agrobacterium rhizogenes* and most stable reference genes for RT-qPCR analysis. **Plant cell reports**, v. 34, n. 11, p. 1987-2000, 2015.

LIANG, Chanjuan; MA, Yongjia; LI, Lingrui. Comparison of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase response to acid rain stress between rice and soybean. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 6, p. 6389-6400, 2020.

LI, Qing et al. Validation of reference genes for real-time quantitative PCR normalization in soybean developmental and germinating seeds. **Plant cell reports**, v. 31, n. 10, p. 1789-1798, 2012.

LIBAULT, Marc et al. Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. **The Plant Genome**, v. 1, n. 1, 2008.

LIN, Yueai et al. Validation of potential reference genes for qPCR in maize across abiotic stresses, hormone treatments, and tissue types. **PLoS one**, v. 9, n. 5, p. e95445, 2014.

LIN, Yinsi et al. Protective effect of *Bruguiera gymnorrhiza* (L.) Lam. fruit on dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice: Role of Keap1/Nrf2 pathway and gut microbiota. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1602, 2020.

LIU, Weican et al. Normalization for relative quantification of mRNA and microRNA in soybean exposed to various abiotic stresses. **PLoS one**, v. 11, n. 5, p. e0155606, 2016.

LIU, Shunzhang et al. Validation of reference genes for reverse transcription real-time quantitative PCR analysis in the deep-sea bacterium *Shewanella psychrophila* WP2. **FEMS microbiology letters**, v. 365, n. 7, p. fny048, 2018.

LIU, Huan et al. A multiplex reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of six main RNA viruses in tomato plants. **Journal of virological methods**, v. 265, p. 53-58, 2019.

MA, Shuhua et al. Expression stabilities of candidate reference genes for RT-qPCR under different stress conditions in soybean. **Plos one**, v. 8, n. 10, p. e75271, 2013.

MACHADO, Ronei Dorneles et al. Comprehensive selection of reference genes for quantitative gene expression analysis during seed development in Brassica napus. **Plant cell reports**, v. 34, n. 7, p. 1139-1149, 2015.

MAGALHÃES, Diogo et al. **Princípios da qPCR**. Introdução às técnicas de PCR convencional, em tempo real e digital/ Tiago Campos Pereira (organizador). – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2018. 113 p.

MANOLI, Alessandro et al. Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 8, p. 807-815, 2012.

MARCELINO-GUIMARÃES, Francismar et al. **Aplicações da qPCR**. Introdução às técnicas de PCR convencional, em tempo real e digital/ Tiago Campos Pereira (organizador). – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2018. 129 p.

MEZERA, M. A. et al. Identification of stable genes in the corpus luteum of lactating Holstein cows in pregnancy and luteolysis: Implications for selection of reverse-transcription quantitative PCR reference genes. **Journal of dairy science**, 2020.

MU, Junyi et al. Genome-wide identification of internal reference genes for normalization of gene expression values during endosperm development in wheat. **Journal of applied genetics**, v. 60, n. 3-4, p. 233-241, 2019.

MUSHTAQ, Rakhshanda et al. Exploration of cotton leaf curl virus resistance genes and their screening in *Gossypium arboreum* by targeting resistance gene analogues. **AoB Plants**, v. 10, n. 6, p. ply067, 2018.

NAKAYAMA, T. J. et al. Reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in soybean plants under hypoxic conditions. **Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2014.

OSTROWSKI, Maciej et al. Biosynthesis pathway of indole-3-acetyl-myoinositol during development of maize (*Zea mays* L.) seeds. **Journal of Plant Physiology**, v. 245, p. 153082, 2020.

OU, Tey Putita et al. Improved detection of dengue and Zika viruses using multiplex RT-qPCR assays. **Journal of Virological Methods**, p. 113862, 2020.

PAPIZH, Svetlana et al. CTNS mRNA molecular analysis revealed a novel mutation in a child with infantile nephropathic cystinosis: a case report. **BMC nephrology**, v. 20, n. 1, p. 400, 2019.

PARISH, Felicia et al. Differential expression of signaling pathway genes associated with aflatoxin reduction quantitative trait loci in maize (*Zea mays* L.). **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2683, 2019.

PARK, Cheol-Kyu et al. Feasibility of liquid biopsy using plasma and platelets for detection of anaplastic lymphoma kinase rearrangements in non-small cell lung cancer. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 145, n. 8, p. 2071-2082, 2019.

PENG, Shuai et al. Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR normalization under ethanol stress conditions in *Oenococcus oeni* SD-2a. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 892, 2018.

PFAFFL, Michael W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology letters**, v. 26, n. 6, p. 509-515, 2004.

RIAZ, Saman et al. Resistance to *Chilo infuscatellus* (Lepidoptera: Pyraloidea) in transgenic lines of sugarcane expressing *Bacillus thuringiensis* derived Vip3A protein. **Molecular Biology Reports**, p. 1-10, 2020.

ROBLEDO, Diego et al. Analysis of qPCR reference gene stability determination methods and a practical approach for efficiency calculation on a turbot (*Scophthalmus maximus*) gonad dataset. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 648, 2014.

SANTOS-FERREIRA, Nânci et al. Hepatitis E virus genotype 3 in echinoderms: first report of sea urchin (*Paracentrotus lividus*) contamination. **Food Microbiology**, p. 103415, 2020.

SATHEESAN, Lija et al. Potential of ovine Wharton jelly derived mesenchymal stem cells to transdifferentiate into neuronal phenotype for application in neuroregenerative therapy. **International Journal of Neuroscience**, p. 1-8, 2020.

SICONELLI, Márcio Junio Lima et al. The Importance of Coordinated Actions in Preventing the Spread of Yellow Fever to Human Populations: The Experience from the 2016-2017

Yellow Fever Outbreak in the Northeastern Region of São Paulo State. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2019, 2019.

SILVER, Nicholas et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC molecular biology**, v. 7, n. 1, p. 33, 2006.

SCHOLDBERG, Tandace A. et al. Evaluating precision and accuracy when quantifying different endogenous control reference genes in maize using real-time PCR. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2903-2911, 2009.

SONG, Jianning et al. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. **Digestive diseases and sciences**, v. 57, n. 4, p. 897-904, 2012.

SONG, Chengchuang et al. RNA-Seq Analysis Identifies Differentially Expressed Genes in Subcutaneous Adipose Tissue in Qaidaford Cattle, Cattle-Yak, and Angus Cattle. **Animals**, v. 9, n. 12, p. 1077, 2019.

STOLF-MOREIRA, Renata et al. Identification of reference genes for expression analysis by real-time quantitative PCR in drought-stressed soybean. **Pesquisa agropecuaria brasileira**, v. 46, n. 1, p. 58-65, 2011.

THIRION, Laurence et al. Development and Evaluation of a Duo Chikungunya Virus Real-Time RT-PCR Assay Targeting Two Regions within the Genome. **Viruses**, v. 11, n. 8, p. 755, 2019.

VANDESOMPELE, Jo 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. research0034. 1, 2002.

VANDESOMPELE, Jo; KUBISTA, Mikael; PFAFFL, Michael W. Reference gene validation software for improved normalization. **Real-time PCR: current technology and applications**, v. 4, p. 47-64, 2009.

VIDAL, F. Etanol de milho: perspectivas para o nordeste diante da crescente produção nacional. **Caderno Setorial ETENE**, ano 5, n° 123, 2020.

VIDOVIĆ, Marija; ĆUKOVIĆ, Katarina. Isolation of high-quality RNA from recalcitrant leaves of variegated and resurrection plants. **3 Biotech**, v. 10, p. 1-8, 2020.

- VIEIRA, G. M.; PEREIRA, T. C. **Histórico da PCR em tempo real**. Introdução às técnicas de PCR convencional, em tempo real e digital/ Tiago Campos Pereira (organizador). – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2018. 107 p.
- WAN, Qiao et al. Stability evaluation of reference genes for gene expression analysis by RT-qPCR in soybean under different conditions. **PLoS One**, v. 12, n. 12, p. e0189405, 2017.
- WANG, Shunli et al. De novo sequencing of tree peony (*Paeonia suffruticosa*) transcriptome to identify critical genes involved in flowering and floral organ development. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 572, 2019a.
- WANG, Guanglong et al. Selection of reliable reference genes for quantitative RT-PCR in garlic under salt stress. **PeerJ**, v. 7, p. e7319, 2019b.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. Disponível em:< <https://covid19.who.int/>>. Acesso em abril de 2021.
- XIE, Fuliang et al. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant molecular biology**, v. 80, n. 1, p. 75-84, 2012.
- YANG, Yuting et al. Selection of reference genes for normalization of microRNA expression by RT-qPCR in sugarcane buds under cold stress. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 86, 2016.
- ZHANG, Xiaochun et al. Identification of salicylic acid conferred resistance genes against gray leaf spot disease in tomato. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 23, n. 1, p. 109-116, 2020a.
- ZHANG, Zhirui et al. Screening and validation of reference genes for real-time quantitative PCR in soybean. **Plant Physiology Journal**, v. 56, ed. 9, p. 1963-1973, 2020b.



**ARTIGO 1**

## FERRAMENTA (RGeasy®) DE ANÁLISE DE GENES DE REFERÊNCIA PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO VIA RT-qPCR

### RESUMO

A quantificação da expressão gênica via RT-qPCR pode ser obtida, a partir da expressão relativa, que é normalizada por meio de genes de referência. Dessa forma, é essencial que os genes propostos como genes de referência sejam validados experimentalmente. Assim, vários estudos são desenvolvidos, para identificar o gene mais estável, entretanto a maioria dessas pesquisas validam genes a situações muito específicas, não explorando todo o potencial da pesquisa já realizada. Essa situação faz com que seja necessária a realização de novos experimentos por parte daqueles que têm interesse em analisar a expressão gênica em combinações de tratamentos e/ou condições não abordadas pelos pesquisadores. Neste estudo, apresentamos o *RGeasy* que visa facilitar a escolha de genes de referência, permitindo a seleção de genes, para maior número de combinações de tratamentos/condições que as disponibilizadas na literatura, por meio apenas de alguns cliques. O *RGeasy* foi validado com um conjunto de dados de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, porém ele poderá fornecer informações de todas as espécies, divididas em três categorias: animal, vegetal e microrganismo. Além de ter acesso ao ranking dos genes de referência mais estáveis, para cada condição ou tratamento, o usuário tem acesso a um conjunto de *primers* para cada um dos genes selecionados.

**Palavras-chave:** Genes endógenos. Expressão relativa. Normalização

## ABSTRACT

Gene expression through RT-qPCR can be performed by the relative quantification method, which requires the expression normalization through reference genes. Therefore, it is essential to validate, experimentally, the chosen reference genes. Thus, although there are several studies that are conducted to identify the most stable reference genes, most of these studies validate genes for very specific conditions, not exploring the whole potential of the research. It turns out that new experiments must be conducted for those that have interest in analyzing gene expression of treatments and/or conditions not explored in these studies. In this study, we present the software *RGeasy*, which aims to facilitate the selection of reference genes, allowing the user to choose genes for a higher number of combinations of treatments/conditions, compared to the ones present in the literature with just a few clicks. *RGeasy* was validated with data from gene expression studies performed in *Coffea arabica* and *Coffea canephora*, however it can provide information for all species from these three groups: animals, plants, and microorganisms. In addition to display a rank of the most stable reference genes for each condition or treatment, the user also has access to primer pairs for the selected reference genes.

**Key-words:** Endogenous genes. Relative expression. Normalization.

## 1 INTRODUÇÃO

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) é considerada, há mais de uma década, a técnica padrão-ouro para a análise de expressão gênica, por sua alta sensibilidade e precisão (UDVARDI; CZECHOWSKI; SCHEIBLE, 2008; DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010).

Visando ao melhoramento genético, é comum a realização de estudos de expressão gênica por RT-qPCR, em culturas agroenergéticas, como: soja (CASAROTTO et al., 2019; MOLINARI et al., 2020), milho (DING et al., 2019; ACOSTA-PEREZ et al., 2020), cana-de-açúcar (NI et al., 2021; SINGH et al., 2021), sorgo (ALI et al., 2018; AKBUDAK; FILIZ; UYLAS, 2019), batata-doce (LI et al., 2019; GUOLIANG et al., 2021) e mandioca (MORGANTE et al., 2020; DOS SANTOS-SILVA et al., 2021), cujo objetivo é compreender melhor os mecanismos moleculares que controlam seus diferentes aspectos de crescimento e desenvolvimento.

A quantificação da expressão gênica, por meio da técnica de RT-qPCR, pode ser feita, a partir dos métodos de expressão absoluta ou expressão relativa (ARABKARI et al., 2019). A expressão absoluta é definida, por meio de uma curva-padrão que é construída, utilizando-se geralmente um DNA plasmidial ou RNA transcrito *in vitro*, sendo possível determinar a quantidade exata de moléculas de DNA-alvo presentes na amostra (QIAGEN, 2014; MAGALHÃES et al., 2018; MARCELINO-GUIMARÃES et al., 2018).

Já a expressão relativa tem seus resultados determinados por ordem de grandeza, obtidos por meio da comparação da amostra-alvo em relação à amostra de referência. Esse tipo de quantificação é preferível à análise de expressão de amostras submetidas a diferentes tipos de tratamentos, o que possibilita um controle de variações por meio dos genes de referência (MAGALHÃES et al., 2018).

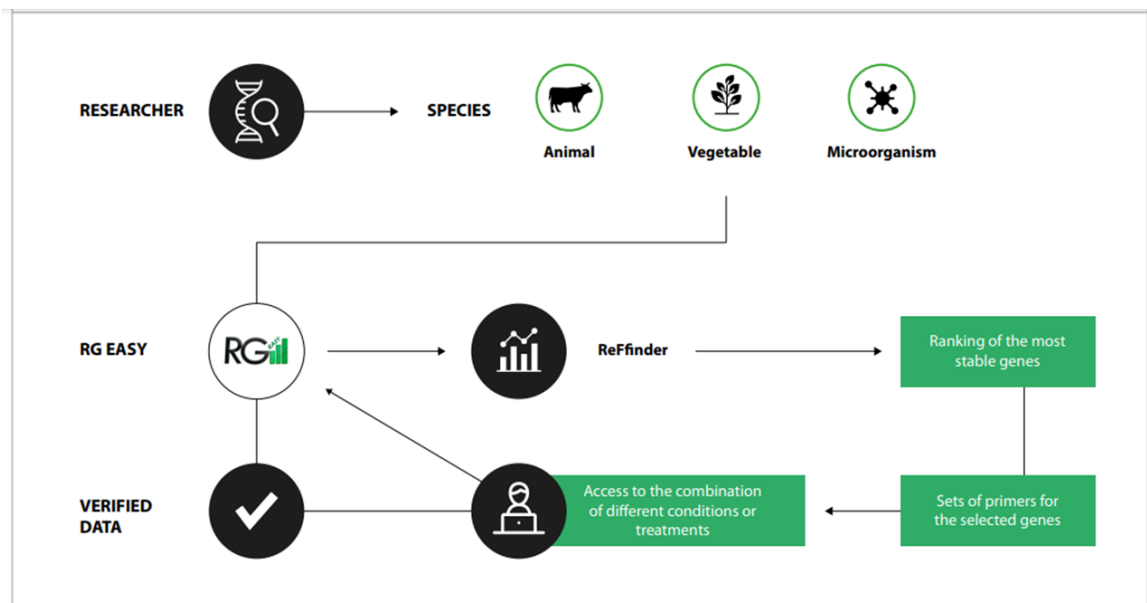
Entre os fatores que podem afetar a confiabilidade dos dados obtidos, a partir da expressão relativa, está a integridade e pureza do RNA a ser utilizado, a qualidade do cDNA, eficiência dos *primers* e a seleção adequada de genes de referência, uma vez que são empregados como normalizadores (DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010).

Os genes de referência possibilitam a normalização dos dados, por apresentarem níveis de expressão relativamente constantes, atuando assim como controles internos (MARCELINO-GUIMARÃES et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2020). Entretanto é essencial que os genes propostos como genes de referência sejam validados, experimentalmente, para comprovar a sua

estabilidade, evitando assim a normalização imprecisa dos dados provenientes da RT-qPCR (FOQUET; SONG, 2020).

Para a normalização, é utilizado o *Ciclo de quantificação (Cq)*, que é definido como o ciclo, no qual o nível de fluorescência atinge o limiar, também chamado de *threshold* (MAGALHÃES et al., 2018). Atualmente, as diversas ferramentas que auxiliam na escolha dos genes mais estáveis utilizam os valores de Cq's, para calcular a expressão relativa, o que não é o ideal, tendo em vista que esse tipo de informação nem sempre é disponibilizada nos artigos científicos. Diante disso, foi desenvolvida a ferramenta *REFERENCE GENE EASY (RGeasy)*, que tem como alvo dois públicos. O primeiro é composto por pesquisadores que já desenvolveram ou desenvolvem estudos de validação de genes de referência e assim podem depositar os dados no banco, fornecendo as informações necessárias, para que seja possível disponibilizar uma classificação de genes de referência a novas combinações de condições/tratamentos; já o segundo público são pesquisadores que vão desenvolver estudos de expressão gênica e podem pular a etapa de validação de genes de referência, pois podem utilizar o *RGeasy* (Figura 1).

**Figura 1-** Manutenção e fluxo de trabalho do *RGeasy*. A partir do cadastro de espécies de animais, vegetais ou microrganismos, os pesquisadores depositam no *RGeasy* os dados, ou seja, valores de Cq's que são imediatamente verificados. Assim, os usuários podem rodar todas as combinações de condições/tratamentos possíveis para cada estudo. A nova combinação de tratamentos é ranqueada pelo RefFinder (XIE et al., 2012), e o *RGeasy* fornece, além do ranking com os genes de referência, um conjunto de *primers* validados para cada gene.



Fonte: Dados da pesquisa.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Plataforma Web

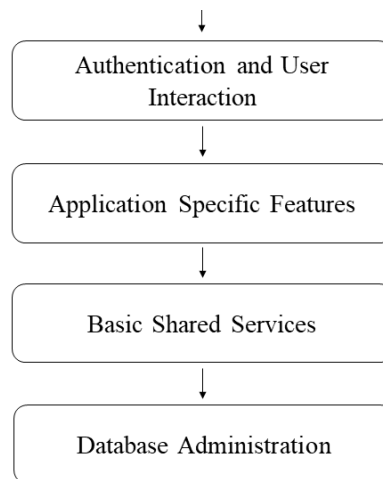
O RGeasy foi criado para ser usado *on-line* na interface de um *website*. A ferramenta funciona, a partir da entrada de um conjunto de dados, em que são estruturados e armazenados em um banco de dados (PRESSMAN; MAXIM, 2019). Os dados de entrada são utilizados para montar uma nova combinação de tratamento que é ranqueada pelo *RefFinder* (XIE et al., 2012).

#### 2.1.1 Arquitetura do Sistema

Para a elaboração do RGeasy, foi utilizada uma estrutura de camadas, como apresentada na Figura 2.

**Figura 4-** Arquitetura de camadas genérica para uma aplicação web.

**Figura 5-** Arquitetura de camadas genérica para uma aplicação web.



Fonte: Adaptada de Sommerville (2019).

A primeira camada é composta pela “Interface baseada em Navegadores”, que corresponde à forma que o usuário irá visualizar o sistema, sendo definida como *layout*. Posteriormente, foram elaboradas as formas de “Autenticação e Interação com o Usuário”, para que seja possível o seu acesso de forma simples e segura. Em seguida, as informações de formulário foram cadastradas no sistema, possibilitando que as “Funcionalidades Específicas da Aplicação” sejam utilizadas de acordo com os dados coletados no banco de dados.

Além da arquitetura de camadas usada como infraestrutura básica, foi utilizada a linguagem UML para a criação de diagramas de casos de uso e diagramas de classe. O UML é uma representação gráfica de modelagem de *software* que auxilia na visualização e documentação do sistema por vários tipos de diagramas (VALENTE, 2020).

### 2.1.2 Linguagens de Programação e Marcação

A linguagem, para a implementação do *RGeasy*, foi PHP, na sua versão 7.4. Além da PHP, foram utilizadas à criação da interface do sistema as linguagens HTML, CSS e JavaScript.

#### 2.1.2.1 HTML e CSS

De acordo com o site *W3Techs* (2021), a linguagem de marcação HTML é usada em 92,2% de todos os sites, sendo o HTML e CSS as linguagens-base para a criação de todos os sites. O HTML gera todos os textos e tabelas e o CSS é o complemento para gerenciar o layout das páginas, com cores, fontes, alinhamentos e responsividade. As versões usadas do HTML e CSS são HTML5 e CSS3 (WALNUT, 2020).

#### 2.1.2.2 JavaScript

A linguagem do lado do cliente, a JavaScript, foi criada em 1995, com um propósito de tratar as entradas de dados de formulários, antes de enviar para as linguagens de servidores da época, como PHP. Atualmente, o JavaScript é uma linguagem completa que pode ser usada como cliente e servidor (FRISBIE, 2020).

#### 2.1.2.3 PHP

O PHP é uma linguagem simples e eficiente, para a criação de páginas dinâmicas em HTML, destacando-se por ser uma linguagem *Server-Side*, sendo empregada em 79,2% de todos os sites pesquisados (*W3Techs*, 2021).

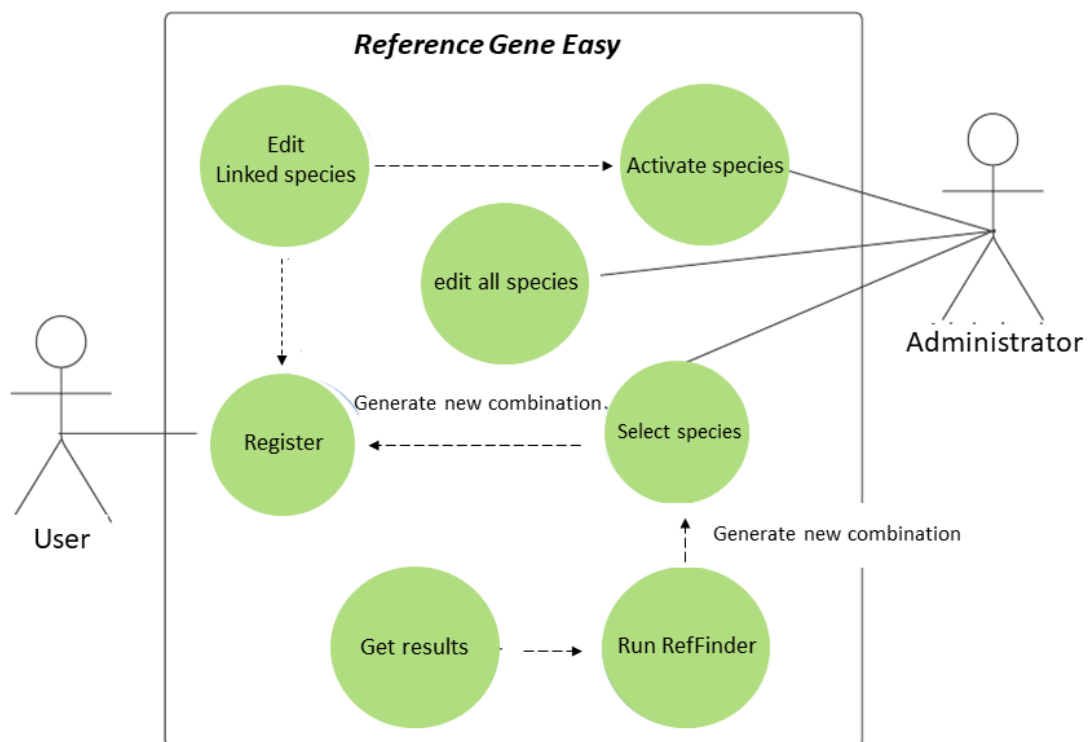
### 2.1.3 Ferramentas de Desenvolvimento

#### 2.1.3.1 UML

### 2.1.3.1.1 Diagrama de caso de uso

O diagrama de casos de uso (Figura 3) é o documento em que são especificados os requisitos, por meio do qual é possível observar como o usuário final interage com o sistema em um determinado contexto. Esse contexto pode ser representado por um texto ou uma lista de tarefas que definem o fluxo de operações (VALENTE, 2020).

**Figura 6-** Diagrama de caso de uso

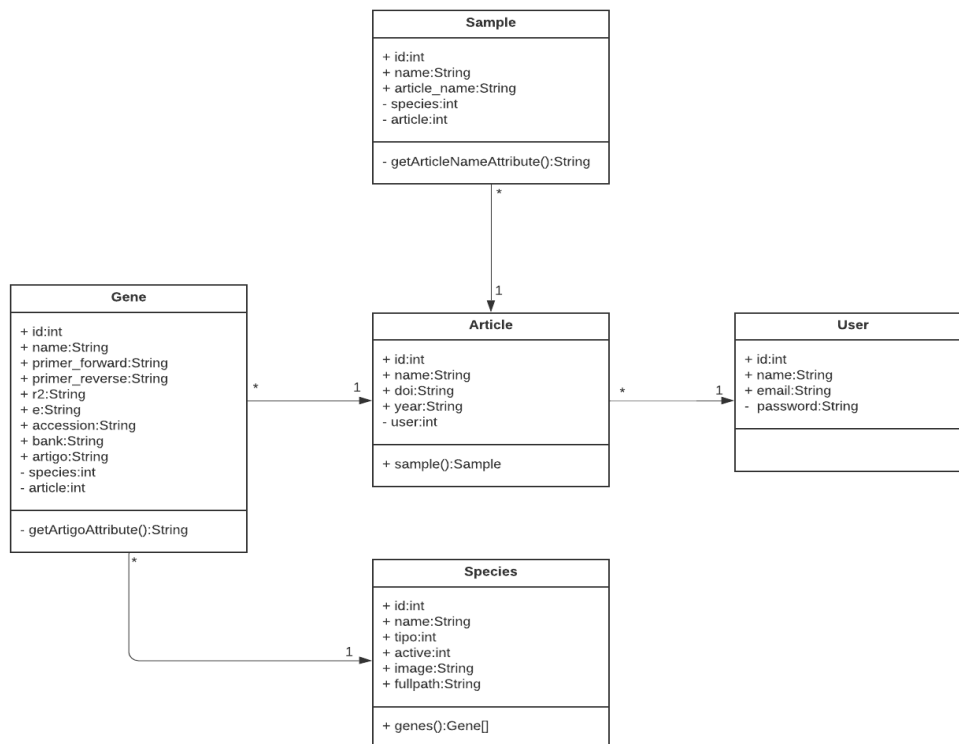


Fonte: Dados da pesquisa.

Já o diagrama de classes apresenta a estrutura estática de um sistema, a partir de suas classes (Figura 4).



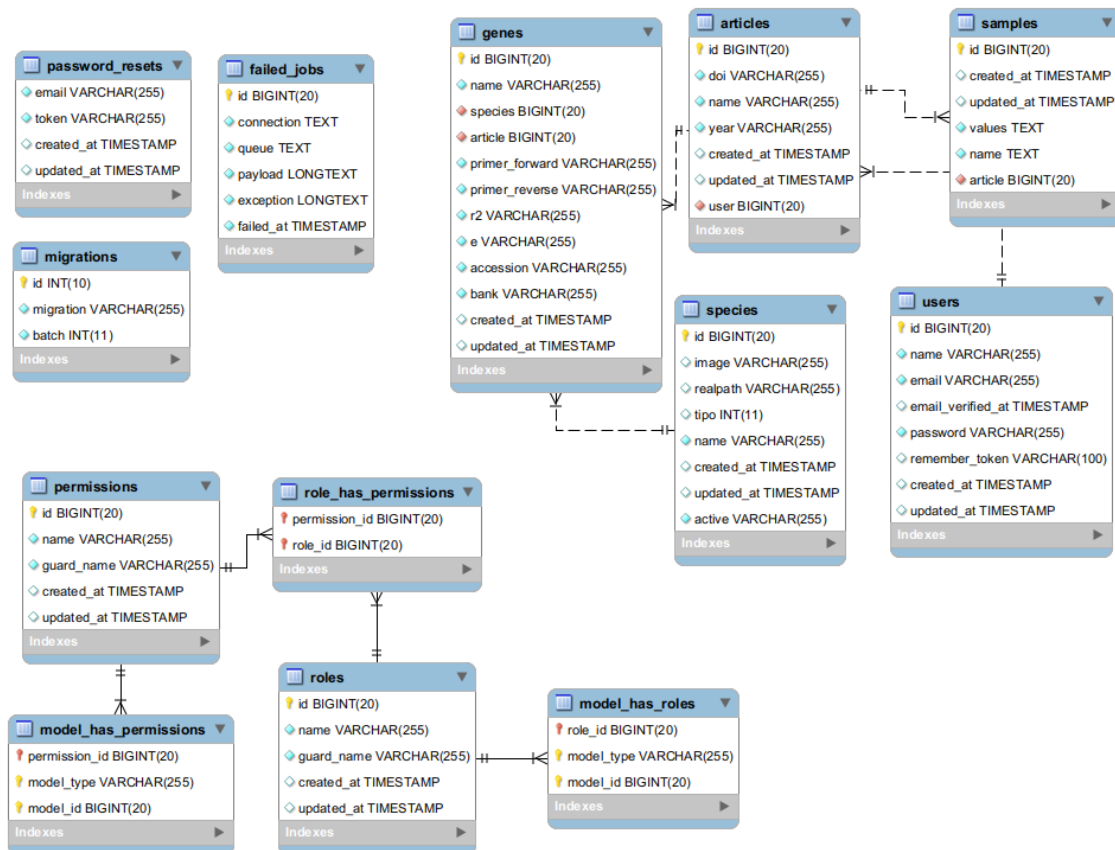
**Figura 4-**Diagrama de classes.



Fonte: Dados da pesquisa.

Com base nos diagramas citados, foram elaborados os diagramas de Entidade-Relacionamento (Figura 5), que são responsáveis por representar a estrutura lógica geral do banco de dados (SILBERSCHATZ; KORTH; SUDARSHAN, 2020). O Diagrama Entidade-Relacionamento do RGeasy está dividido em três grupos: tabelas de informações do *Framework*, tabelas de informação relacionadas às espécies cadastradas e às tabelas de permissões do sistema.

Figura 5-Diagrama Entidade-Relacionamento da base de dados.



Fonte: Dados da pesquisa.

O *framework* fornece uma infraestrutura de código e aplica convenções para reduzir o código e a curva de aprendizado da ferramenta (STAUFFER, 2019). No RGeasy foi utilizado o *framework Laravel* o qual faz uso da arquitetura Model-View-Controller (MVC), que tem como principal vantagem a organização bem definida das camadas, ou grupos de dados.

O gerenciamento do controle de acesso e das coleções de dados foi realizado, utilizando-se o Sistema de Gerenciamento de Banco de dados MySQL (CORONEL et al., 2020), que emprega a linguagem de consulta SQL.

## 2.2 Testes (conjuntos de dados)

Para a validação da ferramenta RGeasy, utilizamos dados de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*), fornecidos pela Universidade Federal de Lavras (UFLA). O primeiro artigo avaliou os tecidos de embriões somáticos, células em suspensão, calos embriogênicos e não

embriogênicos e plântulas de *C. arabica* (FREITAS et al., 2017). O segundo avaliou os tecidos de raiz, ramo, folha, flor e frutos de *C. arabica* e *C. canephora* (FERNANDES-BRUM et al., 2017).

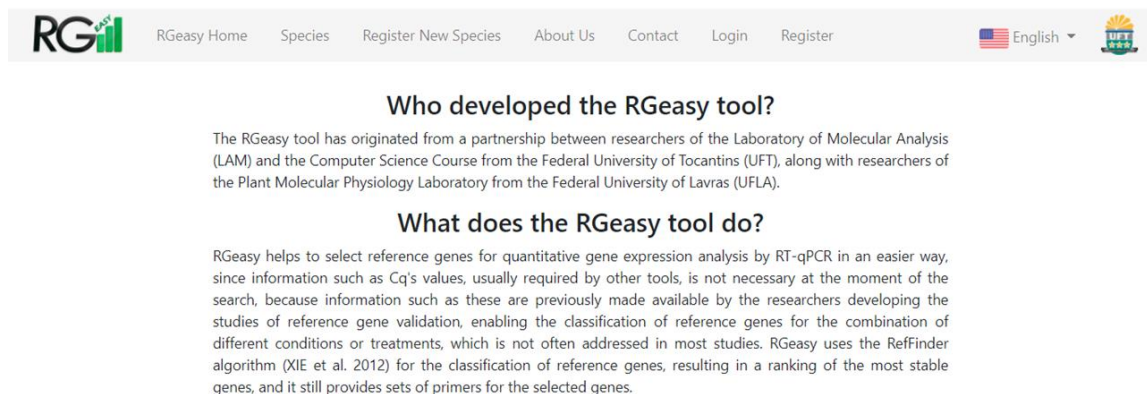
Além disso, foi feito um levantamento de dados sobre estudos de validação de genes de referência para a análise de expressão gênica na cultura do café, nas plataformas *Web of Science* e *Scopus*, utilizando as palavras-chave: Gene reference / Housekeeping gene / Endogenous gene, RT-qPCR e *Coffea*.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Interface gráfica

Na interface gráfica inicial, são disponibilizadas informações sobre os desenvolvedores do *RGeasy*, bem como o que tem a oferecer (Figura 6).

**Figura 6-**Interface gráfica inicial da ferramenta *RGeasy*.



Fonte: Dados da pesquisa.

Ao realizar o cadastro (Figura 7) e o login (Figura 8), o usuário tem acesso às espécies registradas na ferramenta clicando em “Species” na barra de navegação localizada na parte superior.

**Figura 7-** Cadastro do usuário.

Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 8-** Login do usuário.

Fonte: Dados da pesquisa.

As espécies são separadas em três categorias: Animal, Vegetal e Microorganismo (Figura 9).

**Figura 9-** Categorias de espécies do RGeasy.

Fonte: Dados da pesquisa.

Ao clicar na espécie de interesse, são exibidos, automaticamente, todos os estudos de validação de genes de referência cadastrados (Figura 10). Nessa interface, o usuário tem acesso a cada estudo, clicando em seu nome e, abaixo de cada artigo, são exibidas as amostras analisadas.

**Figura 10**-Estudos de validação de genes de referência registrados no *RGeasy*.

The screenshot shows the RGeasy web interface. At the top, there is a navigation bar with the RGeasy logo and links for Home, Species, Register New Species, About Us, Contact, and a user profile. Below the navigation bar, two study cards are displayed. The first card is titled "Validation of reference genes for qPCR analysis of Coffea arabica L. somatic embryogenesis-related tissues" and lists several tissue types with checkboxes: Non-Embryogenic calli, Embryogenic calli, Embryogenic cell suspensions, Plantlets, and Somatic embryos (globular, cordiform/torpedo and cotyledonary). Below these options is a green button labeled "Run Reffinder". The second card is titled "A panel of the most suitable reference genes for RT-qPCR expression studies of coffee: screening their stability under different conditions" and lists various conditions with checkboxes: water-deficit Root, water-deficit Stem, water-deficit Leaf, well-watered Root, well-watered Stem, well-watered Leaf, well-watered Flower, and well-watered Fruit. Below these options is another green button labeled "Run Reffinder".

Fonte: Dados da pesquisa.

Para definir a combinação de tratamentos ou condições desejadas, o usuário deve selecionar as amostras de interesse, clicando no ícone ao lado destas (Figura 10). O resultado é exibido instantaneamente, ao clicar em “Run RefFinder”. Como o *RGeasy* emprega a ferramenta do RefFinder (XIE et al., 2012), para a análise de estabilidade dos genes de referência, na página de resultados, é gerada uma tabela com o ranking dos genes, segundo os seguintes algoritmos: Delta CT, Bestkeeper, Normfinder, Genorm e, por fim, RefFinder. Abaixo desse *ranking* é disponibilizado também um gráfico referente a cada algoritmo.

Ainda, na página dos resultados, o *RGeasy* fornece um quadro com informações gerais para cada um dos genes, de acordo com o *ranking* de estabilidade fornecido pelo RefFinder (XIE et al., 2012). Para cada gene, é disponibilizado o par de *primers*, o coeficiente de correlação ( $R^2$ ), eficiência ( $e^*$ ), número de acesso e o banco em que a sequência foi selecionada. Todas essas informações são disponibilizadas, segundo os dados fornecidos no momento do registro das espécies, que é feito por pesquisadores que desenvolvem estudos de validação de genes de referência.

### 3.2 Testes (conjuntos de dados)

A validação do *RGeasy* foi feita utilizando dados de expressão gênica no cafeeiro. Assim, foi realizada uma busca nas plataformas *Web of Science* e *Scopus* sobre validação de genes de referência, para a cultura do cafeeiro, que resultou em nove artigos, semelhante ao descrito por Fernandes-Brum et al. (2017). A análise criteriosa de cada um desses estudos permitiu observar que cinco não abordaram todas as combinações de condições ou tratamentos possíveis, sendo indicados na coluna “Combinações de tratamentos” da Tabela 2 como “Não foi avaliado”.

A ausência dos valores de Cq's, na maioria dos artigos, impossibilita a definição dos genes de referência, o que confirma a problemática apontada anteriormente. Essa situação faz com que seja necessária a realização de novos experimentos por parte daqueles que têm interesse em analisar a expressão gênica, nas combinações de condições não abordadas pelos pesquisadores, resultando em maior demanda de tempo e outros recursos que poderiam ser evitados.

Em geral, foi possível observar que, em cada estudo em que não foram analisadas todas as combinações, é possível serem feitas, em média, pelo menos mais 10 combinações de tratamentos e condições (Apendice).

**Tabela 2-** Busca nas plataformas *Web of Science* e *Scopus* sobre validação de genes de referência para a cultura do cafeeiro.

N°	Artigo	Espécie	Tecido	Condição experimental	N° de genes testados	Genes recomendados	Combinações de tratamentos
1	Barsalobres-Cavallari et al. (2009)	<i>C. arabica</i>	Raiz, caule, folha, flor e frutos e o seu conjunto	Condições normais Estresse biótico ( <i>Hemileia vastatrix</i> )	8	GAPDH, 14-3-3 e RPL7	Não foi avaliado
2	Cruz et al. (2009)	<i>C. arabica</i>	Raiz e folhas	Estresse hídrico	8	AP47, 24S e UBI9; GAPDH, UBQ10 e 24S	Não foi avaliado
2	Cruz et al. (2009)	<i>C. arabica</i>	Folhas	Diferentes cultivares	8	AP47 e GAPDH	Avaliado
2	Cruz et al. (2009)	<i>C. arabica</i>	Folhas, caules, raízes e frutos maduros na fase cereja	Conjunto dos tecidos	8	UBQ10, 24S e UBI9	Não foi avaliado
3	Vieira et al. (2011)	<i>C. arabica</i>	Folhas	Amostras in vitro e in planta	7	40S_Rib, GADPH e Hv0 0099	Avaliado
4	Goulao et al. (2012)	<i>C. arabica</i>	Folhas	Estresse pelo frio	10	UBQ10, GAPDH, ACT e EF1 $\alpha$	Avaliado
4	Goulao et al. (2012)	<i>C. arabica</i>	Folhas	Estresse hídrico	10	GAPDH, ACT, EF1 $\alpha$ e Apt	Avaliado
4	Goulao et al. (2012)	<i>C. arabica</i>	Folhas	Múltiplos estresses	10	UBQ10, GAPDH, ACT e elf-4 <sup>a</sup>	Avaliado
4	Goulao et al. (2012)	<i>C. arabica</i>	Folhas	Diferentes cultivares	10	GAPDH, UBQ10, AP47 e EF1 $\alpha$	Avaliado
4	Goulao et al. (2012)	<i>C. arabica</i>	Folhas	Combinação de estresses e cultivares	10	GAPDH, Cycl e UBQ10	Avaliado

5	Figueiredo et al. (2013)	<i>C. arabica</i>	Hipocótilos	Estresse biótico ( <i>Colletotrichum kahawae</i> ) em dois genótipos diferentes	10	$\beta$ -Tub9 and IDE	Avaliado
6	de Carvalho et al. (2013)	<i>C. arabica</i>	Folhas e raiz	Privação de nitrogênio	10	MDH, EF1, GAPDH and EF1 $\alpha$	Não foi avaliado
6	de Carvalho et al. (2013)	<i>C. arabica</i>	Folhas	Salinidade	10	EF1, EF1 $\alpha$ , and UBQ10	Não foi avaliado
6	de Carvalho et al. (2013)	<i>C. arabica</i>	Folhas	Estresse térmico	10	MDH, GAPDH, and EF1 $\alpha$	Não foi avaliado
7	Martins et al. (2017)	<i>C. arabica</i>	Folhas	Genótipo e aumento da temperatura e CO2	10	MDH, ACT, and S15	Avaliado
8	Freitas et al. (2017)	<i>C. arabica</i>	Embriões somáticos, células em suspensão, calos embriogênicos e não embriogênicos e plântulas	-	12	24S and PP2A	Não foi avaliado
9	Fernandes-Brum et al. (2017)	<i>C. arabica</i>	Raiz, caule, folha, flor e fruto	Estresse hídrico (WD) e bem irrigado (WW)	12	AP47 / UBQ / RPL39 / EF1 $\alpha$	Não foi avaliado
9	Fernandes-Brum et al. (2017)	<i>C. canephora</i>	Raiz, caule, folha, flor e fruto	Bem Irrigado (WW)	8	ADH2 / ACT / GAPDH / UBQ	Não foi avaliado

Fonte: Dados da pesquisa.



### 3.3 Estudo de caso

O principal objetivo da ferramenta é possibilitar a classificação de genes de referência, para diferentes combinações de condições e tratamentos não abordados, em estudos originais para cada espécie, sem a necessidade de se desenvolverem novos experimentos. Assim, para atestar a confiabilidade dos dados gerados a partir do *RGeasy*, utilizamos os dados de dois artigos intitulados: 1° *Validation of reference genes for qPCR analysis of Coffea arabica L. somatic embryogenesis-related tissues* e 2° *A panel of the most suitable reference genes for RT-qPCR expression studies of coffee: screening their stability under different conditions*, de Freitas et al. (2017) e Fernandes-Brum et al. (2017), respectivamente.

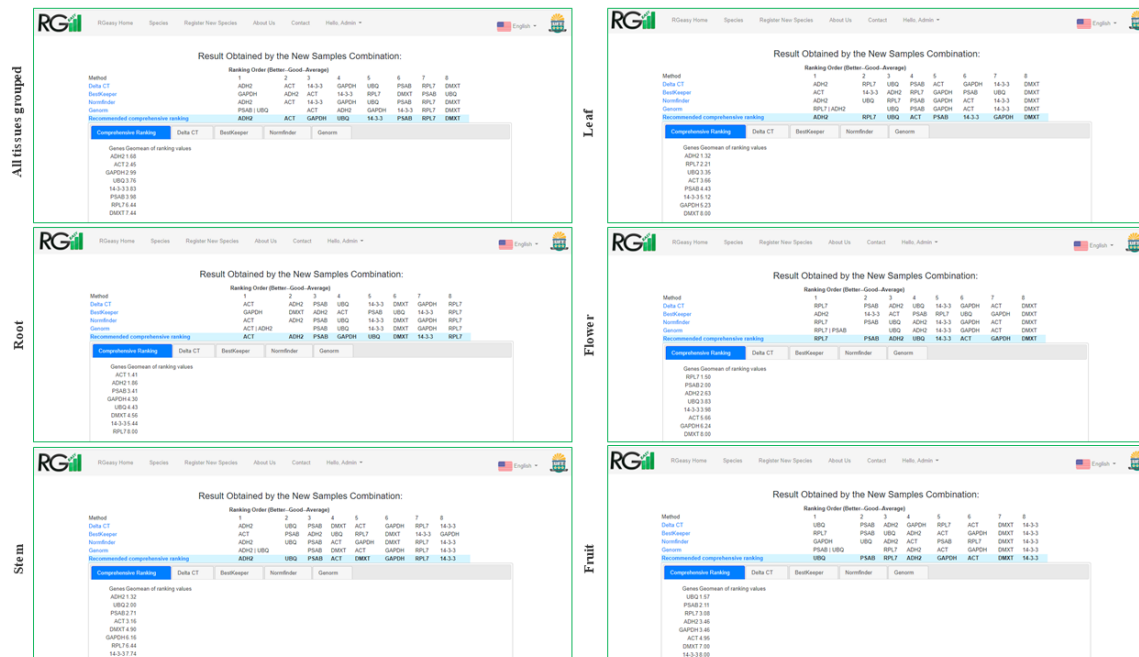
Os dados de cada artigo foram inseridos na ferramenta separadamente, de acordo com a espécie de café estudada (*C. arabica* e *C. canephora*). Como o estudo de Fernandes-Brum et al. (2017) validou um conjunto de genes de referência diferente a cada uma das espécies, o mesmo foi registrado duas vezes.

O estudo de Freitas et al. (2017) é constituído por cinco diferentes tecidos (embriões somáticos, células em suspensão (duas linhagens em seis tempos de cultura diferentes), calos embriogênicos e não embriogênicos e plântulas) e, por 12 genes, candidatos a genes de referência, resultando em um total de 1.728 amostras (contabilizando repetições biológicas e triplicatas técnicas).

Já pesquisa de Fernandes-Brum et al. (2017) analisou cinco tecidos (raiz, ramo, folha, flor e frutos), para as duas espécies de café, porém, para *C. arabica*, os tecidos de raiz, ramo, folha foram submetidos a duas diferentes condições (estresse hídrico e irrigação) e os tecidos de flor e fruto foram analisados somente para a condição irrigada. Foi analisada a estabilidade de 12 genes candidatos a genes de referência, totalizando 864 amostras para *C. arabica*. Para a espécie de *C. canephora*, foram avaliados a estabilidade de oito genes nos cinco tecidos apenas na condição irrigada, resultando em 360 amostras (contabilizando repetições biológicas e triplicatas técnicas).

Para confirmar o funcionamento da ferramenta, após o registro dos dados, foi verificado se o resultado gerado a partir do *RGeasy* corrobora com os descritos, em cada um dos artigos, para as combinações já estudadas. Essa análise permitiu comprovar a eficiência da ferramenta, uma vez que todos os resultados foram os mesmos, como demonstrado na Figura 11 para os dados de *C. canephora*.

**Figura 11-**Ranking gerado no *RGeasy* para as amostras de *C. canephora* analisadas por Fernandes-Brum et al. (2017).



Fonte: Dados da pesquisa.

Posteriormente, foram analisadas combinações não avaliadas nos estudos originais. Na pesquisa desenvolvida por Freitas et al. (2017), foi possível analisar 16 novas combinações (Tabela 3). Tendo em vista que, de acordo com as Diretrizes da Informação Mínima para a Publicação de Experimentos de PCR em Tempo Real (MIQE), devem ser empregados, no mínimo, dois genes de referência, nos estudos de expressão gênica, para que se possa garantir a confiabilidade e reprodutibilidade das informações obtidas (BUSTIN et al., 2009; MARCELINO-GUIMARÃES et al., 2018), foi disponibilizado, nas Tabelas 3, 4 e 5, somente os dois genes de referência mais estáveis para cada nova combinação.

Dos 12 genes testados por Freitas et al. (2017), oito estavam entre os dois genes mais estáveis para algumas das novas combinações. Desses oito genes, apenas o gene *UBQ* foi classificado como estável somente uma vez. Foi possível observar, também, que, de forma geral, os genes *24S* e *PP2A* foram os mais estáveis para as combinações constituídas pelas amostras de embriões somáticos. Contudo as demais combinações resultaram em um par de genes específicos (Tabela 3), indicando a importância da validação dos genes candidatos a genes de referência para cada condição.

**Tabela 3** - Seleção de genes de referência, utilizando a ferramenta *RGeasy*, por meio de uma nova combinação de tratamentos ranqueados pela ferramenta RefFinder (XIE et al., 2012) do estudo desenvolvido por Freitas et al. (2017).

<b>Combinação de tratamentos</b>	<b>Gene</b>
Embriões somáticos e calos embriogênicos	<i>PP2A / 24S</i>
Embriões somáticos e calos não embriogênicos	<i>24S / PP2A</i>
Embriões somáticos e plântulas	<i>PP2A / EF1a</i>
Embriões somáticos, calos embriogênicos e não embriogênicos	<i>PP2A / 24S</i>
Embriões somáticos, células em suspensão, calos embriogênicos e não embriogênicos	<i>24S / PP2A</i>
Embriões somáticos, células em suspensão, calos embriogênicos e plântulas	<i>24S / PP2A</i>
Embriões somáticos, calos embriogênicos, não embriogênicos e plântulas	<i>24S / PP2A</i>
Células em suspensão e calos embriogênicos	<i>ACT / APRT</i>
Células em suspensão e calos não embriogênicos	<i>APRT / EF1a</i>
Células em suspensão e plântulas	<i>TUB / ACT</i>
Células em suspensão, calos embriogênicos e não embriogênicos	<i>EF1a / APRT</i>
Células em suspensão, calos embriogênicos plântulas	<i>ACT / TUB</i>
Células em suspensão, calos embriogênicos, não embriogênicos e plântulas	<i>TUB / EF1a</i>
Calos embriogênicos e plântulas	<i>RPL39 / 24S</i>
Calos não embriogênicos e plântulas	<i>UBQ / PP2A</i>
Calos embriogênicos, não embriogênicos e plântulas	<i>RPL39 / 24S</i>

Fonte: Dados da pesquisa.

Em relação à pesquisa de Fernandes-Brum et al. (2017) para a espécie de *C. arabica* e *C. canephora*, foi possível analisar, respectivamente, 27 e 21 novas combinações (Tabelas 4 e 5).

Os resultados para os tecidos de *C. arabica* mostraram que, para as duas novas combinações nas condições unificadas (water-deficit / well-watered), os genes mais

estáveis foram o *AP47* e o *RPL39* (Tabela 4), semelhante ao indicado também por Fernandes-Brum et al. (2017) em outras combinações nessas condições.

Para a condição de estresse hídrico, foi possível propor três novas combinações, nas quais quatro dos 12 genes de referência analisados apresentaram-se como os mais estáveis (Tabela 4). Dos quatro genes indicados, três (*AP47/ UBQ/ RPL39*) foram semelhantes aos resultados descritos por Fernandes-Brum et al. (2017) na condição de estresse hídrico, porém o gene *24S* indicado para a combinação de “Raiz e Ramo” não havia sido relatado.

Quanto à condição bem irrigada, foram analisadas 22 novas combinações, em que nove dos 12 genes de referência foram relatados pelo menos em uma das combinações propostas (Tabela 4). O gene *14.3.3* e *CYCL*, por exemplo, foram relatados por Fernandes-Brum et al. (2017), exclusivamente, para os tecidos de folha e flor, respectivamente. Já em nossos resultados, o gene *14.3.3* foi o mais estável, para a combinação de “Raiz e Flor”, não estando entre os dois genes mais estáveis para nenhuma combinação constituída por folha, e o gene *CYCL* foi sugerido para a combinação dos tecidos “Ramo e Fruto”, não sendo apropriado para nenhuma das combinações constituídas por flor.

Nossas análises revelaram também que o gene *APT1*, indicado apenas para o tecido de fruto (Fernandes-Brum et al., 2017), apresentou-se como um dos genes mais estáveis para nove combinações das vinte duas apresentadas para *C. arabica* em condição bem irrigada (Tabela 4).

**Tabela 4** - Seleção de genes de referência, utilizando a ferramenta *RGeasy*, por meio de uma nova combinação de tratamentos ranqueados pela ferramenta RefFinder (XIE et al., 2012) do estudo desenvolvido por Fernandes-Brum et al. (2017) para a espécie de *C. arabica*.

<b>Combinação de tratamentos</b>	<b>Gene</b>
Raiz e Ramo (water-deficit / well-watered)	<i>AP47 / RPL39</i>
Folha e Ramo (water-deficit /well-watered)	<i>AP47 / RPL39</i>
Raiz e Ramo (water-deficit)	<i>AP47 / 24S</i>
Raiz e Folha (water-deficit)	<i>UBQ / RPL39</i>
Ramo e Folha (water-deficit)	<i>RPL39 / AP47</i>
Raiz e Ramo (well-watered)	<i>RPL39 / ACT</i>

---

Raiz e Folha (well-watered)	<i>AP47 / RPL39</i>
Raiz e Flor (well-watered)	<i>14.3.3 / RPL39</i>
Raiz e Fruto (well-watered)	<i>APT1 / RPL39</i>
Raiz, Ramo e Folha (well-watered)	<i>RPL39 / AP47</i>
Raiz, Ramo e Flor (well-watered)	<i>APT1 / ACT</i>
Raiz, Ramo e Fruto (well-watered)	<i>APT1 / AP47</i>
Raiz, Folha e Flor (well-watered)	<i>24S / RPL39</i>
Raiz, Folha e Fruto (well-watered)	<i>RPL39 / AP47</i>
Raiz, Flor e Fruto (well-watered)	<i>APT1 / RPL39</i>
Raiz, Ramo, Folha e Flor (well-watered)	<i>AP47 / UBQ</i>
Raiz, Ramo, Folha e Fruto (well-watered)	<i>AP47 / RPL39</i>
Raiz, Ramo, Flor e Fruto (well-watered)	<i>APT1 / AP47</i>
Raiz, Folha, Flor e Fruto (well-watered)	<i>AP47 / RPL39</i>
Ramo e Folha (well-watered)	<i>RPL39 / PP2A</i>
Ramo e Flor (well-watered)	<i>APT1 / AP47</i>
Ramo e Fruto (well-watered)	<i>APT1 / CYCL</i>
Ramo, Flor e Fruto (well-watered)	<i>APT1 / AP47</i>
Folha e Flor (well-watered)	<i>AP47 / PP2A</i>
Folha e Fruto (well-watered)	<i>AP47 / RPL39</i>
Folha, Flor e Fruto (well-watered)	<i>AP47 / UBQ</i>
Flor e Fruto (well-watered)	<i>AP47 / APT1</i>

---

Fonte: Dados da pesquisa.

Segundo Fernandes-Brum et al. (2017), dos oito genes de referência testados para os tecidos de *C. canephora*, cinco (*ADH2*, *ACT*, *UBQ*, *RPL7* e *PSAB*) foram identificados como estáveis nos tecidos analisados individualmente. Contudo, na análise feita a partir do *RGeasy*, para novas combinações, o gene *RPL7* não foi relatado. Além disso, a análise revelou que o gene *ADH2* não está entre os dois genes mais estáveis apenas para quatro das 21 combinações (Tabela 5).

**Tabela 5** - Seleção de genes de referência, utilizando a ferramenta *RGeasy*, por meio de uma nova combinação de tratamentos ranqueados pela ferramenta RefFinder (XIE et al., 2012) do estudo desenvolvido por Fernandes-Brum et al. (2017) para a espécie de *C. canephora*.

Combinação de tratamentos	Gene
Raiz e Ramo	<i>ADH2 / ACT</i>
Raiz e Folha	<i>ACT / ADH2</i>
Raiz e Flor	<i>ADH2 / ACT</i>
Raiz e Fruto	<i>ACT / ADH2</i>
Raiz, Ramo e Folha	<i>ADH2 / ACT</i>
Raiz, Ramo e Flor	<i>ADH2 / ACT</i>
Raiz, Ramo e Fruto	<i>ACT / ADH2</i>
Raiz, Folha e Flor	<i>ADH2 / ACT</i>
Raiz, Folha e Fruto	<i>ACT / ADH2</i>
Raiz, Ramo, Folha e Flor	<i>ADH2 / ACT</i>
Raiz, Ramo, Folha e Fruto	<i>ADH2 / ACT</i>
Ramo e Folha	<i>PSAB / ADH2</i>
Ramo e Flor	<i>PSAB / ADH2</i>
Ramo e Fruto	<i>UBQ / ACT</i>
Ramo, Folha e Flor	<i>PSAB / ADH2</i>
Ramo, Folha e Fruto	<i>UBQ / ACT</i>
Ramo, Folha, Flor e Fruto	<i>UBQ / ADH2</i>
Folha e Flor	<i>ADH2 / PSAB</i>
Folha e Fruto	<i>UBQ / ADH2</i>
Folha, Flor e Fruto	<i>UBQ / PSAB</i>
Flor e Fruto	<i>UBQ / PSAB</i>

Fonte: Dados da pesquisa.

Como citado anteriormente, além da classificação de genes de referência, o *RGeasy* disponibiliza um par de *primers* validados experimentalmente para cada um dos genes analisados (Figura 12), minimizando, dessa forma, mais um fator que pode afetar diretamente a confiabilidade dos dados da RT-qPCR (BUSTIN et al., 2009).

**Figura 12**-Informações gerais de cada gene disponibilizada pelo *RGeasy*.

General Information About the Genes:

Gene: UBQ			Gene: PSAB		
Primer Sequence (Forward)		Primer Sequence (Reverse)	Primer Sequence (Forward)		Primer Sequence (Reverse)
TTTCCTGGCGTGGGTATTG		CGGGTTTATCTCTCCAACGAAT	TTTCCTGGCGTGGGTATTG		CGGGTTTATCTCTCCAACGAAT
R2	e*	Accession n	R2	e*	Accession n
0.99276	95.0	DV686961.1	0.9923	92.0	GT648763.1
Bank			Bank		
GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI)			GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI)		

Fonte: Dados da pesquisa.

Além disso, ressalta-se que a ferramenta *RGeasy* poderá ser utilizada à análise de genes de referência, para diferentes espécies, divididas nas categorias animal, vegetal e microrganismo. Pode ser empregada como, por exemplo, para as culturas de soja e milho, que, na atualidade, são as principais culturas usadas na produção de biodiesel e etanol mundialmente (OECD/FAO, 2019; USDA, 2020). Nas plataformas *Web of science* e *Scopus*, são disponibilizados 14 e quatro artigos sobre validação de genes de referência, para as culturas de soja e milho, respectivamente, dentro do intervalo de 2008 a 2020 e, entre esses trabalhos, há aqueles que não foram explorados em sua totalidade.

## 4 CONCLUSÃO

O banco de dados do *RGeasy* permite a seleção de genes de referência a um maior número de combinações de tratamentos/condições do que é possível extrair de artigos

publicados, com apenas alguns cliques. Este estudo mostra como o *RGeasy* é uma ferramenta que irá revolucionar o campo de pesquisa, no que diz respeito à seleção de genes de referência ao desenvolvimento de estudos de expressão gênica via RT-qPCR. Por meio dessa ferramenta, a etapa do desenvolvimento de experimentos de genes de referência, para muitos organismos (animais, vegetais e microrganismos), pode ser pulada, pois os dados publicados são explorados em sua totalidade, reduzindo o uso de recursos financeiros e diminuindo o tempo necessário à realização de estudos via RT-qPCR, bem como pode proporcionar maior divulgação dos artigos publicados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-PÉREZ, Phamela et al. Characterization of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase genes and analysis of its differential expression in maize (*Zea mays*) seedlings under drought stress. *Plants*, v. 9, n. 3, p. 315, 2020.

AKBUDAK, M. Aydın; FILIZ, Ertugrul; UYLAS, Senem. Identification of O-acetylserine (thiol) lyase (OASTL) genes in sorghum (*Sorghum bicolor*) and gene expression analysis under cadmium stress. *Molecular biology reports*, v. 46, n. 1, p. 343-354, 2019.

ALI, M. Sajjad et al. Identification and Expression Analysis of a Homologue of PR-1 Gene in *Sorghum bicolor*. *International Journal of Agriculture and Biology*, v. 20, n. 6, p. 1318-1324, 2018.

ARABKARI, Vahid et al. Relative and Absolute Expression Analysis of MicroRNAs Associated with Luminal A Breast Cancer—A Comparison. ***Pathology & Oncology Research***, p. 1-12, 2019.

BARSALOBRES-CAVALLARI, Carla F. et al. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. ***BMC molecular biology***, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2009.

BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. ***Clinical chemistry***, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.



CASAROTTO, Gabriele et al. Expression of genes related to soil flooding tolerance in soybeans. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 41, 2019.

CORONEL, Carlos et al. **Data Base Principles-** fundamentals of design, implementation, and management. 3<sup>o</sup> ed. Cengage Learning, 2020.

CRUZ, Fernanda et al. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. **Molecular Breeding**, v. 23, n. 4, p. 607-616, 2009.

DERVEAUX, Stefaan; VANDESOMPELE, Jo; HELLEMANS, Jan. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 227-230, 2010.

DE CARVALHO, Kenia et al. Nitrogen starvation, salt and heat stress in coffee (*Coffea arabica* L.): identification and validation of new genes for qPCR normalization. **Molecular biotechnology**, v. 53, n. 3, p. 315-325, 2013.

DING, Shuangcheng et al. A análise de todo o genoma dos genes da família TCP em *Zea mays* L. identificou um papel para ZmTCP42 na tolerância à seca. *Jornal internacional de ciências moleculares*, v. 20, n. 11, pág. 2762, 2019.

DOS SANTOS, Clesivan Pereira et al. Identification and evaluation of reference genes for reliable normalization of real-time quantitative PCR data in acerola fruit, leaf, and flower. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 2, p. 953-965, 2020.

FERNANDES-BRUM, Christiane Noronha et al. A panel of the most suitable reference genes for RT-qPCR expression studies of coffee: screening their stability under different conditions. **Tree Genetics & Genomes**, v. 13, n. 6, p. 1-13, 2017.

FIGUEIREDO, Andreia et al. Validation of reference genes for normalization of qPCR gene expression data from *Coffea* spp. hypocotyls inoculated with *Colletotrichum kahawae*. **BMC research notes**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2013.

FOQUET, Bert; SONG, Hojun. There is no magic bullet: the importance of testing reference gene stability in RT-qPCR experiments across multiple closely related species. **PeerJ**, v. 8, p. e9618, 2020.

FREITAS, Natália Chagas et al. Validation of reference genes for qPCR analysis of *Coffea arabica* L. somatic embryogenesis-related tissues. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 128, n. 3, p. 663-678, 2017.

FRISBIE, Matt. **Professional JavaScript® for web developers**. Wrox A Willey Brand, 2020.

GOULAO, Luis F.; FORTUNATO, Ana S.; RAMALHO, José C. Selection of Reference Genes for Normalizing Quantitative Real-Time PCR Gene Expression Data with Multiple Variables in *Coffea* spp. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, n. 3, p. 741-759, 2012.

GUOLIANG, Li et al. Selection of suitable reference genes for RT-qPCR normalisation in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) under different stresses. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, v. 96, n. 2, p. 209-219, 2021.

LI, Chuanzhe et al. A novel effect of glycine on the growth and starch biosynthesis of storage root in sweetpotato (*Ipomoea batatas* Lam.). *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 144, p. 395-403, 2019.

MAGALHÃES, Diogo et al. **Princípios da qPCR**. Introdução às técnicas de PCR convencional, em tempo real e digital/ Tiago Campos Pereira (organizador). – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2018. 113 p.

MARCELINO-GUIMARÃES, Francismar et al. **Aplicações da qPCR**. Introdução às técnicas de PCR convencional, em tempo real e digital/ Tiago Campos Pereira (organizador). – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2018. 129 p.

MARTINS, Madlles Q. et al. Selection and validation of reference genes for accurate RT-qPCR data normalization in *Coffea* spp. under a climate changes context of interacting elevated [CO<sub>2</sub>] and temperature. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 307, 2017.

MOLINARI, Mayla Daiane Correa et al. Overexpression of AtNCED3 gene improved drought tolerance in soybean in greenhouse and field conditions. *Genetics and molecular biology*, v. 43, 2020.

MORGANTE, Carolina Vianna et al. Genetic and physiological analysis of early drought response in *Manihot esculenta* and its wild relative. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 42, n. 2, p. 1-11, 2020.

NI, Yang et al. Discovery of genes involved in anthocyanin biosynthesis from the rind and pith of three sugarcane varieties using integrated metabolic profiling and RNA-seq analysis. *BMC plant biology*, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2021.

OECD/FAO. Agricultural Outlook 2020-2029. Disponível em: [https://stats.oecd.org/viewhtml.aspx?datasetcode=HIGH\\_AGLINK\\_2020&lang=en](https://stats.oecd.org/viewhtml.aspx?datasetcode=HIGH_AGLINK_2020&lang=en). Acesso em 3 de junho de 2021.

PRESSMAN, R.; MAXIM, B. **Software Engineering - A Practitioner's Approach**. 9<sup>o</sup> ed. New York: McGraw-Hill Education, 2019.

QIAGEN. QuantiFast SYBR Green PCR Handbook. For fast, quantitative, real-time PCR and two-step RT-PCR using SYBR Green. Qiagen, 2014. 44p. Available from: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=43137f31-afd9-4916-b53c-c18b0fe505b8&lang=en> >. Accessed: August 24, 2020.

SILBERSCHATZ, A.; KORTH, H.; SUDARSHAN, S. **Database System Concepts**. 7<sup>o</sup> ed. New York: McGraw-Hill Education, 2020.

SINGH, Pratiksha et al. Comparative analysis of protein and differential responses of defense-related gene and enzyme activity reveals the long-term molecular responses of sugarcane inoculated with *Sporisorium scitamineum*. *Journal of Plant Interactions*, v. 16, n. 1, p. 12-29, 2021.

SOMMERVILLE, Ian. **Engineering Software Products - An Introduction to Modern Software Engineering**. United States of America: Pearson Education, 2019.

STAUFFER, Matt. **Laravel Up & Running - A Framework for Building Modern PHP Apps**. O'Reilly Media, 2019.

UDVARDI, Michael K.; CZECHOWSKI, Tomasz; SCHEIBLE, Wolf-Rüdiger. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *The Plant Cell*, v. 20, n. 7, p. 1736-1737, 2008.

USDA. **Biofuels Data Sources**. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/about-ers/partnerships/strengthening-statistics-through-the-icars/biofuels-data-sources/#one>. Acesso em 03 de junho de 2021.

VALENTE, Marco Tulio. **Engenharia de Software Moderna: Princípios e Práticas para Desenvolvimento de Software com Produtividade**, 2020.

VIEIRA, Ana et al. Validation of RT-qPCR reference genes for in planta expression studies in *Hemileia vastatrix*, the causal agent of coffee leaf rust. **Fungal biology**, v. 115, n. 9, p. 891-901, 2011.

WALNUT, Ryan. **Learn how to create your website with HTML5 & CSS 3**. Bilal MAB, 2020.

W3TECHS. **Usage statistics of server-side programming languages for websites**. Disponível em: <<https://w3techs.com/faq>>. Acesso em 10 de Abril 2021.

XIE, Fuliang et al. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant molecular biology**, v. 80, n. 1, p. 75-84, 2012.

## APENDICE

**Tabela 6**-Combinações de tratamentos/condições não exploradas nos artigos de validação de genes de referência para o gênero *Coffea*.

Artigo	Autor	Espécie	Combinações não exploradas
<p style="text-align: center;">Identification of suitable internal control genes for <i>Coffea arabica</i> under experimental conditions</p>	<p style="text-align: center;">Barsalobres-Cavallari et al. (2009)</p>	<p style="text-align: center;"><i>C. arabica</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Raiz e Caule</li> <li>- Raiz e Folha</li> <li>- Raiz e Flor</li> <li>- Raiz e Fruto</li> <li>- Raiz, Caule e Folha</li> <li>- Raiz, Caule e Flor</li> <li>- Raiz, Caule e Fruto</li> <li>- Raiz, Caule, Folha e Flor</li> <li>- Raiz, Caule, Folha e Fruto</li> <li>- Caule e Folha</li> <li>- Caule e Flor</li> <li>- Caule e Fruto</li> <li>- Caule, Folha e Flor</li> <li>- Caule, Folha e Fruto</li> <li>- Caule, Folha, Flor e Fruto</li> <li>- Folha e Flor</li> <li>- Folha e Fruto</li> <li>- Folha, Flor e Fruto</li> <li>- Flor e Fruto</li> </ul>
			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Raízes e Folhas com estresse hídrico</li> <li>- Folhas</li> <li>- Caules</li> <li>- Raízes</li> <li>- Frutos maduros</li> </ul>

<p>Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR</p>	<p>Cruz et al. (2009)</p>	<p><i>C. arabica</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Folhas e Caules</li> <li>- Folhas e Raízes</li> <li>- Folhas e Frutos maduros</li> <li>- Folhas, Caules e Raízes</li> <li>-Folhas, Caules e Frutos maduros</li> <li>-Folhas, Raízes e Frutos maduros</li> <li>- Caules e Raízes</li> <li>- Caules e Frutos maduros</li> <li>-Caules, Raízes e Frutos maduros</li> <li>- Raízes e Frutos maduros</li> </ul>
<p>Nitrogen Starvation, Salt and Heat Stress in Coffee (<i>Coffea arabica</i> L.): Identification and Validation of New Genes for qPCR Normalization</p>	<p>de Carvalho et al. (2013)</p>	<p><i>C. arabica</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Folhas em privação de nitrogênio e folhas em condição salina</li> <li>-Folhas em privação de nitrogênio e folhas em estresse térmico</li> <li>-Folhas em condição salina e Folhas em estresse térmico</li> <li>- Folhas em privação de nitrogênio, folhas em condição salina e folhas em estresse térmico.</li> </ul>

Fonte: Dados da pesquisa.