

SELEÇÃO DE NORMALIZADORES PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR EM PLÂNTULAS DE ARROZ SOB ESTRESSE SALINO

GABRIELA PERES MORAES¹; LETÍCIA CARVALHO BENITEZ^{2*}; MARCELO NOGUEIRA DO AMARAL²; ISABEL LOPES VIGHI²; PRISCILA ARIANE AULER²; EUGENIA JACIRA BOLACEL BRAGA³

¹Universidade Federal de Pelotas – gabriela.moraes.freitas@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Pelotas – jacirabraga@hotmail.com

*Auxílio financeiro CAPES/FAPERGS

1. INTRODUÇÃO

A cultura do arroz pode ser fortemente influenciada por um grande número de fatores ambientais. Dentre os fatores abióticos, a salinidade dos solos e da água de irrigação constitui um dos principais problemas para a agricultura irrigada. Fisiologicamente, o estresse salino inibe o crescimento e desenvolvimento das plantas, reduzindo o potencial osmótico da solução do solo, restringindo a disponibilidade da água e/ou acumulando íons em excesso nos tecidos vegetais, podendo ocasionar toxicidade iônica, desequilíbrio nutricional, entre outros distúrbios (TESTER; DAVENPORT, 2003).

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram mecanismos que as permitem perceber as variações nas condições ambientais, ativando cascatas de transdução de sinais, que, por consequência, ativam genes de resposta ao estresse levando a mudanças fisiológicas e bioquímicas (COTSAFTIS et al., 2011). Uma das técnicas de biologia molecular amplamente utilizada para a validação dos dados de expressão gênica é a RT-qPCR (quantitative RT-PCR), pois apresenta sensibilidade e reprodutibilidade na análise de transcritos (GACHON et al., 2004). Esta técnica necessita de uma padronização para a correta interpretação dos dados, a qual é feita pela análise dos genes alvo comparados com um ou mais genes constitutivos que possuam expressão uniforme nas condições experimentais. Estes genes constitutivos são chamados de normalizadores na técnica de RT-qPCR (BASTOLLA, 2007).

Considerando que tanto a sequência do gene constitutivo como a sequência do gene de interesse (alvo) estarão presentes na amostra testada, o primeiro não deverá apresentar variação significativa de expressão, pois se trata de um gene de referência e o segundo poderá apresentar diferentes padrões de expressão dentro do experimento (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al. 2008). Geralmente são escolhidos como normalizadores genes que se encontram envolvidos em processos celulares básicos, como manutenção da estrutura celular e metabolismo primário (CZECHOWSKI et al. 2005)

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão de dez genes constitutivos e identificar normalizadores com expressão estável para estudos de expressão gênica por RT-qPCR em plântulas de arroz sob estresse salino.

2. METODOLOGIA

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) dos genótipos BRS Bojuru (tolerante ao sal) e BRS Ligeirinho (sensível ao sal) foram colocadas para germinar e transferidas

para potes plásticos contendo areia como substrato e mantidas em casa de vegetação. Ao atingirem o estágio V₄, as plantas foram submetidas à irrigação alternada, com solução nutritiva (HOAGLAND e ARNON, 1938) e água contendo NaCl na concentração de 150 mM (100 mL/pote). Foram realizadas cinco coletas, de folhas, com intervalo de 24 horas. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 2 x 5 (2 genótipos x 5 tempos de exposição ao sal) e 3 repetições biológicas.

O RNA total foi extraído com o reagente *Plant RNA Reagent Purilink®* e o cDNA fita simples foi sintetizado por transcrição reversa utilizando o *Kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR®*. Foram selecionados como possíveis normalizadores dez genes frequentemente utilizados como controle interno nas análises de RT-qPCR e que, supostamente, não apresentam variação significativa entre os tratamentos analisados. Os genes selecionados foram: *Actina11*, *Ubiquitina-E2*, *Fator alongamento eucariótico 1-α*, *Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*, *β-Tubulina*, *Fator de iniciação eucariótica 4a*, *Ubiquitina10*, *Ubiquitina5*, *Aquaporina TIP41* e *Ciclofilin*.

A especificidade e curva padrão de eficiência dos *primers* foram avaliadas para cada genótipo. A eficiência da PCR (E) foi obtida a partir de quatro diluições seriadas de cDNA (1:1; 1:5; 1:25 e 1:125) para gerar a curva padrão de cada par de *primer* testado. Foram selecionados os *primers* que obtiveram valores de eficiência entre 1,8 e 2,2, o que corresponde a uma eficiência entre 90 e 110%.

Foram considerados estáveis aqueles genes normalizadores com menores valores de desvio padrão e coeficiente de variação. Paralelamente às análises estatísticas, a estabilidade dos normalizadores para ambos os genótipos, foi avaliada através da ferramenta RefFinder, a qual integra os algoritmos computacionais geNorm e NormFinder (CHEN et al., 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A especificidade da amplificação foi determinada pela presença de um único pico presente na curva de dissociação (*Melting*) e a eficiência de amplificação dos *primers* foi calculada individualmente a partir do Logaritmo (Log) das diluições de cDNA, para cada um dos genótipos. As análises demonstraram eficiências próximas a 100%, variando entre 1,85 e 2,16, indicando que ao final de cada ciclo, o transcrito molde é duplicado, com variação de 10%, o que não interfere significativamente nos resultados obtidos.

A partir dos dados apresentados na Tabela 1, referentes aos valores de Desvio Padrão (DP) e Coeficiente de Variação (CV%), observou-se que, dentre os genes testados, *UBQ10* é o que apresenta os menores valores de DP total (0,18) e CV% total (18,52), seguido pela *UBQ5* e *ACT11*, indicando maior estabilidade de expressão destes genes. Por outro lado, para *TIP41-Like*, *Eif-4α* e *Cyclophilin* foram observados valores de DP entre 9,10 e 10,10 e de CV% entre 169,22 e 269,0. Somado a isso, foi possível inferir que há uma maior variação na estabilidade da expressão dos genes no genótipo BRS Ligeirinho, sensível ao estresse salino, com exceção do gene *Eef-1α*, para o qual os valores de desvio padrão foram maiores no genótipo BRS Bojuru.

Tabela 1. Média geral (\bar{x}), Desvio Padrão (DP) e Coeficiente de Variação (CV%) de dez genes candidatos a normalizadores, para os genótipos, BRS Bojuru e BRS Ligeirinho, submetidas a cinco tempos de exposição a 150 mM de NaCl

		<i>ACT11</i>	<i>β-TUB</i>	<i>Eef-1α</i>	<i>UBC-E2</i>	<i>eIF-4α</i>	<i>UBQ10</i>	<i>UBQ5</i>	<i>GAPDH</i>	<i>TIP41-</i>	<i>Cyclophilin</i>
\bar{x}	BRS Bojuru	1,08	1,11	1,32	0,81	0,76	0,97	0,91	0,46	0,77	1,04
	BRS Ligeirinho	1,23	1,03	0,66	1,58	7,28	0,90	1,078	1,71	11,17	9,11
	\bar{x} geral	1,15	1,07	0,99	0,90	4,02	0,94	0,998	1,09	5,97	5,07
DP	BRS Bojuru	0,38	0,46	1,67	0,17	0,33	0,15	0,17	0,35	0,29	0,29
	BRS Ligeirinho	0,31	0,30	0,33	0,91	14,82	0,19	0,23	1,57	12,39	11,68
	DP total	0,35	0,39	1,23	0,75	10,00	0,18	0,22	1,29	10,10	9,10
CV%	BRS Bojuru	35,19	41,89	126,0	21,75	43,38	15,35	18,78	76,75	31,37	23,71
	BRS Ligeirinho	25,62	29,83	49,60	57,55	203,0	21,35	21,87	91,91	110,92	128,22
	CV total	30,41	36,44	123,9	63,04	269,0	18,52	21,91	118,22	169,22	179,22

Com base nos valores de estabilidade média de expressão (M) calculados para os dez genes, mostrados na Figura 1, observou-se que *ACT11/UBQ10* (M=0,404) são os genes mais estáveis, seguidos de *β-Tubulin* (M=0,598) e *GAPDH* (M=1,177), *eIF-4a* (M=1,315) e *Cyclophilin* (M=1,495), como os mais variáveis. Estes dados estão de acordo com os encontrados por CALDANA et al. (2007), os quais ao analisarem o perfil de expressão de fatores de transcrição de arroz, identificaram o gene *ACT1*(AK071586) como um dos mais estáveis para experimentos com estresse salino. Por outro lado, NICOT et al. (2005), observaram variações significativas para o mesmo gene em *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L..

De acordo com GUTIERREZ et al. (2008), os valores de M, obtidos nestes algoritmos, para serem considerados estáveis precisam de M<0,5. Esta afirmação indica o gene *UBQ10* como o mais indicado a ser utilizado como normalizador para análises de RT-qPCR, em folhas de plantas de arroz submetidas a 150 mM de NaCl, uma vez que os valores de M para este gene foram de 0,404 e 0,327 utilizando os algoritmos geNorm, NormFinder, respectivamente.

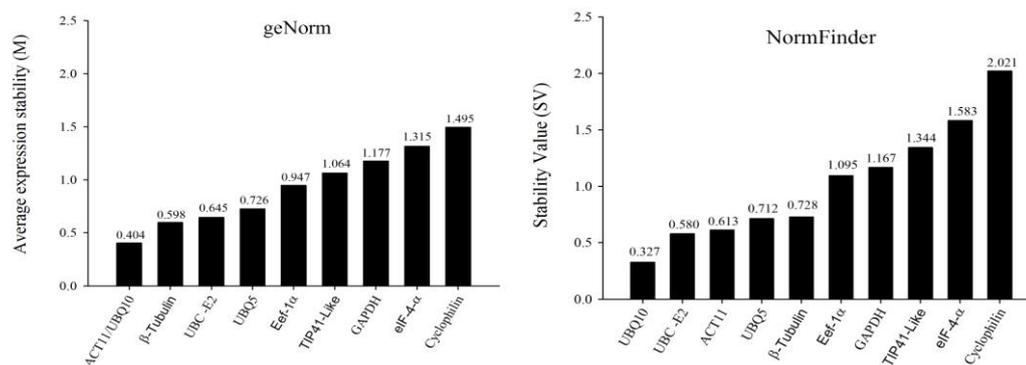


Figura 1. Estabilidade média de expressão (M) e Valor de Estabilidade (SV), de acordo com o algoritmos geNorm e o NormFinder, em dez genes candidatos a normalizadores para as genótipos de arroz, BRS Bojuru e BRS Ligeirinho, submetidas a cinco tempos de exposição a 150 mM de NaCl.

4. CONCLUSÕES

A análise da estabilidade de expressão de dez genes candidatos a normalizadores para estudos de RT-qPCR, sugere o gene constitutivo *UBQ10* o mais adequado para estudos em folhas de arroz dos genótipos, BRS Bojuru (tolerante) e BRS Ligeirinho (sensível), submetidas ao estresse salino.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASTOLLA, F. **Seleção e avaliação de genes de referência para estudos de expressão gênica em *Eucalyptus***. 2011. 83f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. CALDANA C.; SCHEIBLE W-R.; ROEBER B.M.; RUZICIC S. A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. **Plant Methods**, Reino Unido, v.3, p.1-7, 2007. CHAO W.S.; DOGRAMACI M.; FOLEY M.E.; HORVATH D.P. Selection and validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis in Leafy Spurge *Euphorbia esula*, **Plos One**, Estados Unidos, v.7, p.1-10, 2012. CHEN L; ZHONG H.Y.; KUANG J.F.; LI J.G.; LU W.J.; CHEN J.Y. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. **Planta**, Alemanha, v.390, p.234:377, 2011. COTSFTIS O.; PLETT D.; JOHNSON A.A.T. Root-specific transcript profiling of contrasting rice genotypes in response to salinity stress. **Molecular Plant**, China, v.4, p.25-41, 2011. CZECHOWSKI T.; STITT M.; ALTMAN T.; UDVARDI M.K. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. **Plant Physiology**, França, v.139, p.5-17, 2005. EXPÓSITO-RODRÍGUEZ M.; BORGES A.A.; BORGES-PÉREZ A.; PÉREZ J.A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, Estados Unidos, v.8, p.131, 2008. GACHON C.; MINGAN A.; CHARRIER B. Real time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**. Reino Unido, v.55, p.1445-1454, 2004. GUTIERREZ L.; MAURIAT M.; GUÉNIN S. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**, Reino Unido, v.6, p.609-618, 2008. HOAGLAND D.R.; ARNON D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Estados Unidos: University of California College of Agriculture Berkeley, 1938. NICOT N.; HAUSMAN J.F.; HOFFMANN L.; EVERS D. Housekeeping gene selection for real time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, Reino Unido, v.56, p.2907-2914, 2005. TESTER M.; DEVENPORT R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. **Annals of Botany**, Reino Unido, v.91, p.503-527, 2003.