

Padronização de reações de PCR quantitativo para avaliação dos perfis de expressão gênica dos genes *SbTF1* e *SbTF2*

Daiane da Silva Menezes¹, Beatriz de Almeida Barros², Jurandir Vieira Magalhães³

¹ Estudante do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM, Bolsista FAPEMIG – PIBIC; ² Analista do Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo; ³ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

Introdução

Uma das principais limitações à produção vegetal e ao uso agrícola dos solos ácidos é a toxidez do alumínio (Al), que limita o crescimento vegetal em solos com pH < 5,5. Um importante mecanismo fisiológico de tolerância ao alumínio em plantas consiste na atividade de transportadores de membrana que promovem a liberação de ácidos orgânicos do ápice radicular, que é o local onde o Al exerce efeitos fitotóxicos. Uma vez na rizosfera, os ácidos orgânicos formam complexos estáveis e não tóxicos com íons Al³⁺ (KOCHIAN et al., 2015).

Em sorgo, o gene *SbMATE* codifica uma proteína transportadora da família MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family*), que confere tolerância a Al por meio da liberação de citrato ativada por Al nos ápices radiculares (MAGALHÃES et al., 2007). Variações na sequência da região codificante do gene *SbMATE* não explicaram a tolerância diferencial ao Al entre linhagens de sorgo tolerantes e sensíveis ao metal. Por outro lado, a expressão do gene *SbMATE* foi correlacionada com a tolerância ao Al, sugerindo que a tolerância é primariamente condicionada pela regulação transcricional do gene *SbMATE* (MAGALHÃES et al., 2007). No entanto, linhagens isogênicas (NILs), geradas a partir da introgressão assistida por marcadores do loco *Alt_{SB}* (que contém o gene *SbMATE*), apresentaram uma redução na tolerância ao Al quando comparadas aos parentais doadores. Essa transferência incompleta da tolerância ao Al para as NILs foi coincidente com uma redução da expressão do gene *SbMATE*, sugerindo a atuação de locos regulatórios atuando em *trans* no gene de tolerância (MELO et al., 2013).

Trabalhos prévios levaram à identificação de dois fatores de transcrição que podem regular a expressão do gene *SbMATE*, denominados de *SbTF1* e *SbTF2* (publicação em preparação).

Como parte de uma caracterização inicial, foram realizadas análises de expressão gênica temporal desses transfatores na presença e na ausência de Al. Assim, o presente trabalho descreve a padronização das reações de PCR quantitativo para avaliação dos perfis de expressão gênica dos genes *SbTF1* e *SbTF2*.

Material e Métodos

Duas linhagens tolerantes ao Al (SC566 e SC283) e duas sensíveis (BR012 e BR007) foram utilizadas como material genético nesse trabalho. A exposição das plântulas ao alumínio foi feita em solução nutritiva contendo 0 ou 27 μM de atividade de Al^{3+} , conforme descrito por Caniato et al. (2011). Para a análise de expressão gênica, cada unidade experimental consistiu de 21 ápices radiculares coletados após cinco dias de exposição ao Al. Após a coleta, os ápices foram imediatamente congelados em N_2 líquido. O RNA total foi extraído com auxílio do kit RNEasy Plant Mini Kit (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante, e quantificado por espectrofotometria. A integridade das amostras de RNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 2%. O cDNA foi sintetizado a partir de 2 μg de RNA total utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), também de acordo com as recomendações do fabricante. A padronização das reações para *SbTF1* e *SbTF2* e a obtenção do perfil de expressão do gene *SbMATE* foram conduzidos no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System com sistema de detecção baseado em SYBR Green. Para os genes *SbTF1* e *SbTF2*, as reações foram realizadas utilizando 2,5 pmol de cada primer e cálculo de eficiência foi realizado por meio de curva padrão de quatro pontos e um fator de diluição de 10X. Para o perfil de expressão do gene *SbMATE*, as reações foram conduzidas como descrito por Melo et al. (2013). O gene de referência utilizado foi o 18S ribossomal e a expressão gênica relativa foi calculada conforme o método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando-se três repetições técnicas por amostra.

Resultados e Discussão

Para as reações de PCR quantitativo, o RNA total dos ápices radiculares coletados após cinco dias de exposição ao Al foi extraído e visualizado sob eletroforese

em gel de agarose. O perfil demonstrou que todas as amostras estavam íntegras e em boa concentração (Figura 1). Após a síntese de cDNA, o perfil de expressão do gene *SbMATE* foi obtido, mostrando que a exposição ao Al induziu a expressão do *SbMATE* na linhagem tolerante e a reprimiu nas linhagens sensíveis (Figura 2).

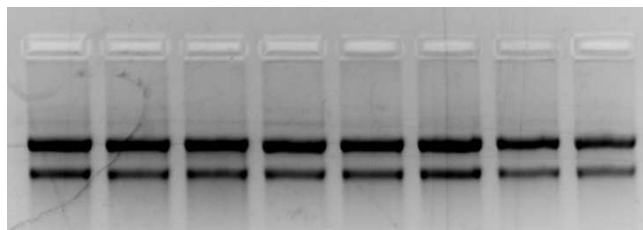


Figura 1: Análise de integridade das amostras de RNA obtidas a partir de ápices radiculares das linhagens SC566 (1 e 2), SC283 (3 e 4) e BR012 (5 e 6) e BR007 (7 e 8). Canaletas ímpares: amostras com -Al. Canaletas pares: amostras com +Al.

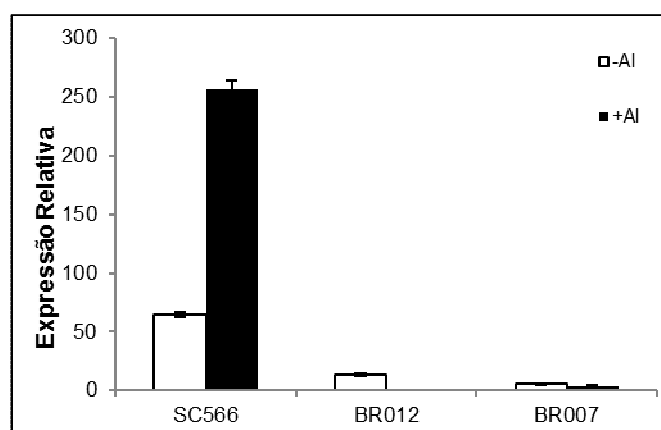


Figura 2: Perfil de expressão do gene *SbMATE* na linhagem tolerante SC566 e nas sensíveis BR012 e BR007 5 dias de exposição ao Al (0 e 27 μ M). As barras representam o desvio padrão das médias da expressão relativa (RQ) obtidas por qPCR.

Esse perfil de expressão foi semelhante ao obtido por Magalhães et al. (2007) e Melo et al. (2013), o que evidencia que o experimento foi realizado em boas condições e o processamento das amostras foi feito de forma adequada e eficiente.

Após essa confirmação, ensaios de curva padrão foram realizados para os genes *SbFT1* e *SbFT2*. As curvas foram feitas em quatro pontos a partir de uma diluição seriada (10X). A especificidade de cada reação foi acessada através das curvas de

melting. As curvas padrão mostraram uma eficiência de reação de 90,75% e 108,28% para *SbFT1* e *SbFT2*, respectivamente (Figura 3a e 3b). Reações com eficiência variando entre 90 a 110% são consideradas precisas para realização de quantificação relativa da expressão gênica, já que a premissa de que a quantidade de produto dobra a cada ciclo, assumida no desenvolvimento do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, é real quando se obtém reações com eficiência próximas a 100% (BUSTIN et al., 2009).

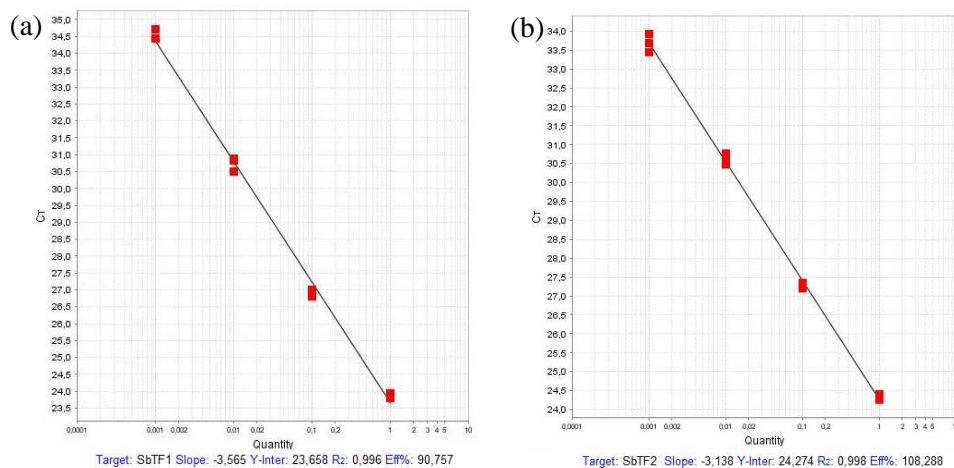


Figura 2: Curvas padrão obtidas para os genes *SbTF1* (a) e *SbTF2* (b) mostrando eficiências de reação de 90,757 e 108,288, respectivamente.

Além da eficiência, outro fator importante é a especificidade da reação. Para que se tenha uma quantificação precisa é necessário que se garanta que somente o produto do gene alvo seja amplificado. A partir das curvas de *melting* obtidas para os dois genes de interesse foi possível verificar a ocorrência de um pico único (Figura 4a e 4b), o que significa que cada reação é específica para o gene de interesse.

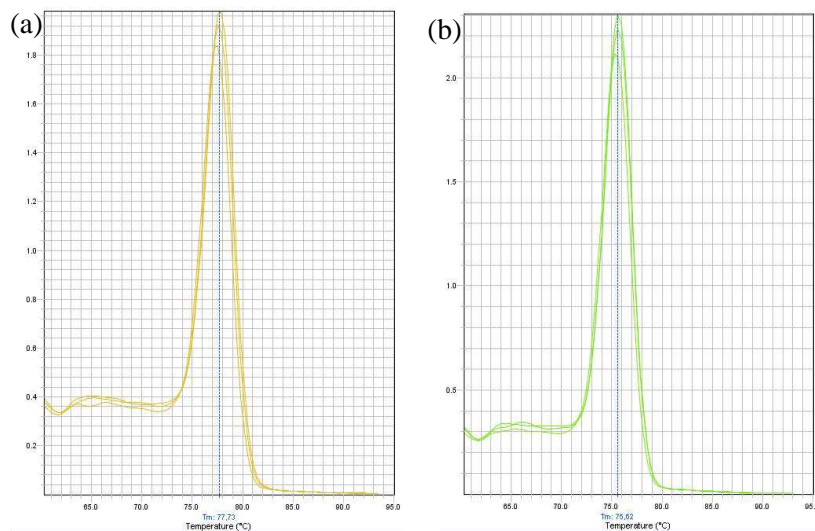


Figura 4: Curvas de *melting* obtidas para os genes *SbTF1* (a) e *SbTF2* (b) mostrando que cada reação é específica para o gene de interesse.

Conclusão

Os resultados obtidos a partir das condições de reação testadas no permitem garantir que essas condições podem ser utilizadas com segurança para a caracterização acurada do perfil de expressão dos genes *SbFT1* e *SbFT2*. Essas análises farão parte da caracterização funcional e molecular detalhada desses genes que é fundamental para o completo entendimento dos seus papéis nos mecanismos de tolerância ao Al em sorgo.

Referências

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CANIATO, F. F.; GUIMARAES, C. T.; HAMBLIN, M.; BILLOT, C.; RAMI, J.-F.; HUFNAGEL, B.; KOCHIAN, L. V.; LIU, J.; GARCIA, A. A. F.; HASH, C. T.; RAMU, P.; MITCHELL, S.; KRESIVICH, S.; OLIVEIRA, A. C. de; AVELLAR, G. de; BORÉM, A.; GLASZMANN, J.-C.; SCHAFFERT, R. E.; MAGALHAES, J. V. The relationship between population structure and aluminum tolerance in cultivated sorghum. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 6, p. 1-14, Jun. 2011.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; LIU, J.; MAGALHAES, J. V. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 66, p. 571-598, 2015.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-ddCt. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MAGALHÃES, J. V. de; LIU, J.; GUIMARAES, C. T.; LANA, U. G. de P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y.-H.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, 2007.

MELO, J. O.; LANA, U. G. de P.; PIÑEROS, M. A.; ALVES, V. M. C.; GUIMARAES, C. T.; LIU, J.; ZHENG, Y.; ZHONG, S.; FEI, Z.; MARON, L. G.; SCHAFFERT, R. E.; KOCHIAN, L. V.; MAGALHAES, J. V. de. Incomplete transfer of accessory loci influencing SbMATE expression underlies genetic background effects for aluminum tolerance in sorghum. **The Plant Journal**, Oxford, v. 73, p. 276-288, Jan. 2013.

YAMAJI, N.; HUANG, C. F.; NAGAO, S.; YANO, M.; SATO, Y.; NAGAMURA, Y.; MA, J. F. A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. **Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 10, p. 3339-3349, 2009.