

PROSPECÇÃO DE NORMALIZADORES PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA DE ARROZ EM BAIXA TEMPERATURA

Sonia Mendonça Poletto¹; Leticia Carvalho Benitez²; Marcelo Nogueira do Amaral²; Isabel Lopes Vighi²; Priscila Ariane Auler²; Gabriela dos Santos Rodrigues²; Antonio Costa de Oliveira¹; Luciano Carlos da Maia¹; Ariano M. Magalhães Jr³; Eugenia Jacira Bolacel Braga²

Palavras-chave: Estresse por frio, *Oryza sativa*, PCR quantitativo em tempo real.

INTRODUÇÃO

Cultivado e consumido em todos os continentes, o arroz (*Oryza sativa* L.) destaca-se pela produção e área de cultivo, desempenhando papel estratégico tanto no âmbito econômico quanto social. Para a atual safra brasileira 2014/15 a produção média de arroz deverá ser 2,3% superior em relação à safra 2013/14, atingindo 12.399,5 mil toneladas. Dentre os estados produtores de arroz no Brasil, o Rio Grande do Sul (RS) destaca-se através do cultivo de arroz irrigado em uma área de 1.120,1 mil hectares, com produtividade média de 7.500 kg ha⁻¹ (CONAB, 2015). Esse êxito tem sido relacionado ao uso de cultivares com alto potencial produtivo aliado a boas práticas de manejo, como a semeadura antecipada.

Dentre os fatores prejudiciais ao cultivo do arroz, cita-se a incidência de baixas temperaturas. A tolerância a esta condição é buscada, principalmente, nas fases iniciais da planta, com a intenção de antecipar a semeadura e evitar que a fase reprodutiva coincida com a época de início de frio, quando contornar o problema se torna mais difícil. Além disso, com a semeadura antecipada, o período reprodutivo coincidirá com uma época de maior intensidade de radiação solar (dezembro/janeiro, no RS). Porém, para que esta prática seja viável é necessária a seleção de cultivares que possam ser semeadas ainda com solo frio e com maior tolerância nas fases iniciais da planta (germinação/emergência e período vegetativo) (Mertz et al., 2009).

A técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) é um dos métodos mais precisos para a análise quantitativa da expressão de genes. Entretanto, esta técnica necessita da normalização dos dados através de genes constitutivos que apresentem níveis de expressão uniforme nas condições experimentais avaliadas, os quais são chamados de normalizadores (Bastolla, 2007). Com o intuito de avaliar a estabilidade de expressão de genes normalizadores, vários algoritmos foram desenvolvidos nos últimos anos, dentre eles aqueles usados nos programas geNorm, NormFinder, BestKeeper e o método comparativo de C_T (Silver et al., 2006).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão de seis genes e identificar normalizadores com expressão estável para estudos de expressão gênica por RT-qPCR em plantas de arroz submetidas ao estresse por frio na fase vegetativa.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido utilizando a cultivar BRS Pampa (subespécie *indica*). As sementes foram germinadas em rolo de papel a uma temperatura de 28°C por sete dias em BOD. Posteriormente, as plântulas foram transplantadas para bandejas plásticas (3L) contendo solo adubado conforme as recomendações para a cultura do arroz irrigado. Foram utilizadas três bandejas com 30 plântulas/bandeja, as quais foram mantidas em casa de

¹ Titulação, Instituição, endereço, e-mail.

² Titulação, Instituição.

³ Titulação, Instituição.

vegetação com temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ até as plantas atingirem o estágio de quatro folhas. Após este período as bandejas foram transferidas para câmara de crescimento com temperatura de 13°C durante cinco dias. A irrigação foi realizada com solução nutritiva de Yoshida (1976). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições biológicas. A coleta do material para as análises (folhas) foi realizada da seguinte forma: C1=plantas não expostas ao frio; C2=6 horas de frio; C3=24 horas de frio; C4=48 horas de frio e C5=72 horas de frio.

O RNA total foi extraído a partir de 100mg, de acordo com o método descrito para o reagente *Plant RNA Reagent Purilink* (Invitrogen™), sendo a quantidade e pureza mensuradas em NanoDrop ND-1000, enquanto que a qualidade e integridade do RNA foram verificadas em eletroforese com gel de agarose 1,0%. Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa a partir de 2 μg de RNA total utilizando o kit *SuperScript First-Strand System for RT-PCR* (Invitrogen™). O volume total das reações de RT-qPCR foi de 12 μl , sendo 6,25 μl do fluoróforo SYBR Green (Roche®), 0,25 μl (10 mM) de cada primer (*forward* e *reverse*), 1 μl de cDNA (diluição 1:5, previamente definida) e 4,25 μl de água ultra pura. As reações foram realizadas em Termociclador Bio-Rad CFX Real Time.

Foram selecionados como possíveis normalizadores seis genes citados na literatura em trabalhos com arroz e que, supostamente, não apresentam variação significativa. Os genes selecionados foram: *ACT11*, *UBC-E2*, *Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*, *Ubiquitina10*, *Aquaporina TIP41* e *Ciclofilina*. Somente iniciadores que apresentaram curva de dissociação com pico único e eficiência de amplificação próxima a 100% foram utilizados neste estudo (Tabela 1).

Para verificar a estabilidade dos normalizadores foram comparadas as alterações nos níveis de expressão nas amostras com 24, 48, 72 e 96 horas de exposição ao estresse em relação às amostras controle (sem estresse). A fórmula utilizada para o cálculo da estabilidade foi: $\Delta\text{CT}_{\text{amostraN}} = \text{CT}_{\text{amostraN}} - \text{CT}_{\text{controle}}$. A partir dos valores dos ΔCT obtidos foram calculados os valores de Quantificação Relativa (QR), através da modificação na fórmula original $\text{QR} = 2^{-\Delta\text{CT}}$ $\text{QR} = 2^{-\Delta\text{CT}}$. Estes dados foram analisados através da ferramenta RefFinder (<http://www.leonxie.com/>), a qual integra os algoritmos computacionais geNorm, NormFinder, BestKeeper e o método comparativo de C_T para comparar e classificar a estabilidade dos genes candidatos a normalizadores. Além da análise separada em cada algoritmo, utilizou-se uma classificação geral do melhor normalizador para a condição experimental testada.

Tabela 1. Descrição dos genes candidatos a normalizadores para reações de RT-qPCR em plantas de arroz sob estresse por frio.

GENE	ACESSO	PRIMER F (5'-3')	PRIMER R (5'-3')
<i>ACT11</i>	AK10026 7	CAGCCACACTGTCCCCATCTA	AGCAAGGTCGAGACGAAGGA
<i>UBC -E2</i>	AK05969 4	CCGTTTGTAGAGCCATAATTGC A	AGGTTGCCTGAGTCACAGTTAAG TG
<i>UBQ10</i>	AK10154 7	TGGTCAGTAATCAGCCAGTTTG G	GCACCACAAATACTTGACGAACA G
<i>GAPDH</i>	AK06496 0	AAGCCAGCATCCTATGATCAGA TT	CGTAACCCAGAATACCCTTGAGT TT
<i>TIP41</i>	AK10351 1	GTTTGGATGAACCCCGCAA	GGCAACAAGGTCAATCCGATC
<i>Cyclophilii</i>	AK12130		

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estabilidade média de expressão dos genes, calculada pelos algoritmos do programa GeNorm, utiliza o princípio de que a razão da expressão de dois genes de referência deve ser constante. O valor de estabilidade é definido como a variação média de um gene em relação a todos os outros testados. Com base nos valores de M calculados para os seis genes, mostrados na Figura 1A, observou-se que *ACT11/UBQ10* ($M=0,261$) são os genes mais estáveis, enquanto *Cyclophilin* ($M=0,649$) e *TIP41-Like* ($M=0,761$), os mais variáveis. O método comparativo de C_T (Figura 1B), apresentou uma ordem de estabilidade de expressão, para os genes candidatos a normalizadores, igual ao algoritmo GeNorm, porém o mesmo apresentou valores de estabilidade diferentes para cada gene, variando de $M=0,611$ (*UBQ10*) a $0,984$ (*TIP41-Like*).

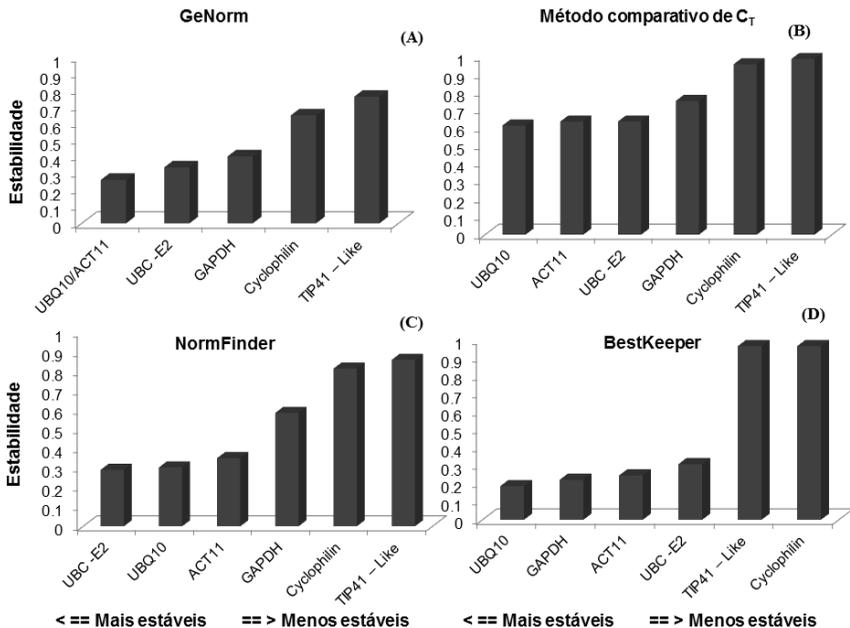


Figura 1. Variação da estabilidade média de expressão de seis genes candidatos a normalizadores, para o genótipo de arroz BRS Pampa, submetidos a cinco tempos de exposição ao frio ($13\text{ }^{\circ}\text{C}$), de acordo com os algoritmos dos programas GeNorm (A), Método Comparativo de C_T (B), NormFinder (C) e BestKeeper (D)

De acordo com o algoritmo do programa NormFinder (Figura 1C) o gene que possui menor valor de variação na estabilidade é *UBC-E2*, com $M=0,291$, seguido de $M=0,303$ para *UBQ10*. Os maiores valores de estabilidade variável foram os de *Cyclophilin* ($M=0,612$) e *TIP41-Like* ($M=0,857$). O algoritmo do programa BestKeeper apontou *UBQ10* e *GAPDH* ($M=0,187$ e $M=0,222$, respectivamente), como os genes mais estáveis, enquanto *TIP41-Like* e *Cyclophilin*, ambos com $M=0,964$, como os menos estáveis (Figura 1D).

Além da análise separada em cada algoritmo utilizado, uma classificação geral do melhor normalizador para a condição experimental testada foi obtida através de uma combinação

dos resultados dos quatro algoritmos (Figura 2). Esta classificação geral corrobora as classificações obtidas nas demais análises, sendo os genes *UBQ10* e *ACT11* os que apresentaram menor variação na estabilidade média de expressão. Estes dados estão de acordo com os encontrados por Moraes (2013), os quais descrevem estes genes como os mais estáveis para experimentos com estresse salino em plantas de arroz. Entretanto, ao contrário do observado neste trabalho, onde os genes *TIP41-Like* e *Cyclophilin* foram os menos estáveis em plântulas de arroz submetidas a baixas temperaturas, Caldana et al. (2007) obtiveram padrões de expressão estáveis para esses genes em experimentos com estresse salino.

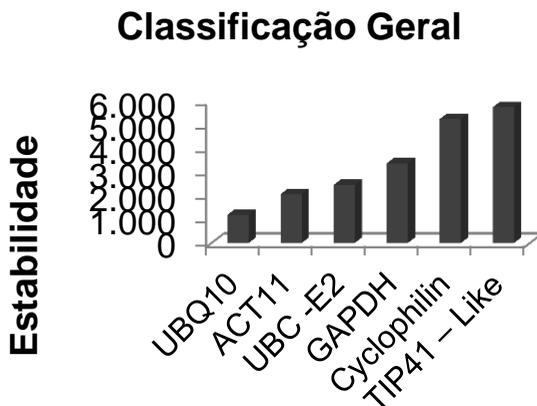


Figura 2. Classificação geral da variação média de expressão de seis genes candidatos a normalizadores, para o genótipo de arroz BRS Pampa, submetidos a cinco tempos de exposição ao frio (13 °C), de acordo com a combinação dos algoritmos geNorm, NormFinder, Método Comparativo de C_T e BestKeeper.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem indicar os genes *UBQ10* e *ACT11* como os mais indicados para estudos de RT-QPCR com plantas de arroz sob estresse por baixa temperatura, uma vez que foram os que apresentaram menor variabilidade média de expressão.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a EMBRAPA-CLIMA TEMPERADO, Estação Experimental Terras Baixas, pelas sementes utilizadas neste trabalho. A FAPERGS, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASTOLLA, F. **Seleção e avaliação de genes de referência para estudos de expressão gênica em *Eucalyptus***. 2007. 85f. Dissertação de mestrado Biologia Celular e Molecular, UFRGS.
- Caldana, C. et al. (2007). A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. **Plant Methods** 3-7, 2007.
- CONAB. Arroz - Brasil. **Acompanhamento da Safra Brasileira-Grãos**: Oitavo Levantamento, Maio/2015. Disponível em: <www.conab.gov.br> Acesso em: Junho de 2015.

MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; SOARES, R.C.; BALDIGA, R.F.; PESKE, F.B.; MORAES, D.M. de. Alterações fisiológicas em sementes de arroz expostas ao frio na fase de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.254-262, 2009.

MORAES, G. P. **Expressão diferencial de genes normalizadores e da família LTPS1, em genótipos de arroz sob estresse salino**. 2013. 85 f. Dissertação de Mestrado – UFPel.

SILVER, N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 7: 33-42, 2006.