

SELEÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA PLANTAS DE ARROZ EM ESTRESSE POR FRIO

IVANELI SCHREINERT¹; LETÍCIA CARVALHO BENITEZ²; ISABEL LOPES VIGHI²; MARCELO NOGUEIRA DO AMARAL²; GABRIELA PERES MORAES²; PRISCILA ARIANE AULER²; GABRIELA DOS SANTOS RODRIGUES²; EUGENIA JACIRA BOLACEL BRAGA³

¹Aluna do curso de Agronomia da UFPel – ivanelisch@hotmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da UFPel - lecbenitez@gmail.com

³Professora do Depto de Botânica da UFPel - jacirabraga@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O arroz pertence à família das gramíneas (Poaceae) e as espécies cultivadas pertencem ao gênero *Oryza*, o qual, provavelmente, teve origem há cerca de 130 milhões de anos. O Brasil figura entre os dez países onde mais se produz arroz, sendo China e Índia os maiores produtores. Dentre os estados brasileiros, o Rio Grande do Sul (RS) destaca-se pelo cultivo de arroz irrigado em uma área de 1.120,1 mil hectares, com produtividade média de 7.500 kg ha⁻¹ (CONAB, 2015).

Todas as espécies de planta têm seu próprio requerimento de temperatura ideal para o pleno crescimento e desenvolvimento, sendo o estresse por frio um problema que atinge plantas de arroz em 25 países, com impactos negativos na produtividade (CRUZ et al., 2013).

O controle genético da tolerância ao frio ainda não está totalmente elucidado, porém, sabe-se que este é controlado por vários grupos de genes e que, em diferentes estádios de desenvolvimento da planta a tolerância é controlada por diferentes gênicos que atuam de forma independente ou interagindo entre si nos períodos de germinação, vegetativo e reprodutivo. Além disso, trabalhos relatam que plantas de arroz expostas a baixas temperaturas apresentam várias mudanças em seu transcriptoma e proteoma (RABBANI et al., 2003).

Estudos de genômica funcional em arroz têm utilizado diferentes metodologias para identificar os genes expressos em diferentes condições ambientais. Dentre estas metodologias estão os macro e microarranjos, SAGE (*serial analysis of gene expression*), MPSS (*massive parallel signature sequencing*), RT-qPCR (*real time quantitative polymerase chain reaction*), e, mais recentemente, RNA-seq (RNA sequencing) (NOBUTA et al., 2007).

A técnica de RT-qPCR está fundamentada no processo de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da DNA-polimerase com a marcação de moléculas fluorescentes ligadas de forma covalente aos nucleotídeos dos *amplicons* sintetizados. No entanto, para que esta técnica seja eficiente é necessária a normalização de dados por meio de genes de referência, indispensável para a comparação das análises da expressão gênica em amostras de diferentes tecidos ou condições ambientais de cultivo (MORAES et al., 2015). Como não existe um gene de referência universal, este deve ser validado para o tipo de amostra estudada.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão de seis genes constitutivos e selecionar genes de referência para estudos com plantas de arroz em estresse por frio.

2. METODOLOGIA

Sementes de arroz dos genótipos BRS Bojuru e BRS Pampa foram desinfestadas e germinadas em rolo de papel a uma temperatura de 28°C por três dias em BOD. Posteriormente, as plântulas foram transplantadas para bandejas contendo solo comercial, as quais foram mantidas em casa de vegetação com temperatura de 28 ± 2°C até as plântulas atingirem o estágio vegetativo de quatro folhas. Após este período as bandejas foram transferidas para câmara de crescimento com temperatura de 13°C durante cinco dias. O experimento foi conduzido em DIC com três repetições biológicas/tratamento, sendo cada repetição composta por uma bandeja com 15 plântulas/genótipo. A irrigação foi realizada com solução nutritiva e a coleta do material para as análises (folhas) realizada da seguinte forma: 0 hora: C1 (coleta 1) = 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 100 mg de folhas de acordo com o protocolo do reagente *Plant RNA Reagent Purilink* (Invitrogen™). A quantidade e pureza foram mensuradas através de NanoDrop ND-1000, enquanto que a qualidade e integridade foram verificadas em eletroforese com gel de agarose 1,5%. Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa a partir de 2 µg de RNA total em um volume final de 20 µL utilizando o kit *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen™). O volume total das reações de RT-qPCR foi de 12 µL e realizadas em Termociclador Bio-Rad CFX Real Time.

Para verificar a estabilidade dos genes 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. A fórmula utilizada para o cálculo da estabilidade foi semelhante à proposta por CHAO et al. (2012):

$$\Delta C_{T\text{amostra}N} = C_{T\text{amostra}N} - C_{T\text{controle}}.$$

A partir dos valores de ΔC_T foram calculados os valores de quantificação relativa (QR), através da modificação na fórmula $QR = 2^{-(\Delta \Delta C_T)}$ para $QR = 2^{-(\Delta C_T)}$, os quais foram submetidos à análise de variância, sendo considerados significativos valores de $P \leq 0,05$. Posteriormente, calculou-se o desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%). Foram considerados estáveis aqueles genes cuja análise de variância não detectou significância para o fator tempo de exposição ao frio e ausência de interação, bem como, aqueles com menores valores de desvio padrão e coeficiente de variação. As análises foram realizadas no *Software SAS v.9.3* (SAS Institute Inc., Cary, NC) e os genes testados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos possíveis genes de referência para reações de RT-qPCR em plantas de arroz sob estresse por frio

Gene	Acesso	Primer F (5'-3')	Primer R (5'-3')
ACT11	AK100267	CAGCCACACTGTCCCCATCTA	AGCAAGGTCGAGACGAAGGA
β -Tubulina	AK072502	GCTGACCACACCTAGCTTTGG	AGGGAACCTTAGGCAGCATGT
Eef-1 α	AK061464	TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT	GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA
UBC -E2	AK059694	CCGTTTGTAGAGCCATAATTGCA	AGGTTGCCTGAGTCACAGTTAAGTG
eIF-4-a	AK073620	TTGTGCTGGATGAAGCTGATG	GGAAGGAGCTGGAAGATATCATAGA
UBQ10	AK101547	TGGTCAGTAATCAGCCAGTTTGG	GCACCACAAATACTTGACGAACAG

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância, não foi observada interação significativa entre os fatores analisados para nenhum dos genes testados. Para os genes *ACT11*, *β -Tubulina* e *Eef-1 α* houve significância para genótipo, enquanto que para os genes *Eef-1 α* e *eIF-4 α* observou-se diferença estatística para o fator tempo de exposição ao frio, demonstrando que estes genes apresentam variação nos valores de C_T e QR ao longo do tempo de exposição ao estresse. As Ubiquitinas são proteínas envolvidas em complexos de sinalização, na estrutura da cromatina, reparo de DNA e regulação da endocitose (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2009). Dentre os genes analisados, *UBQ10* e *UBC-E2* foram os únicos que não apresentaram variação significativa para nenhum dos fatores (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância para seis possíveis genes de referência para estudos de arroz sob estresse por frio. (*) Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de F.

Quadrado Médio							
Fatores	G.L.	<i>ACT11</i>	<i>β-Tubulina</i>	<i>Eef-1α</i>	<i>UBC-E2</i>	<i>eIF-4α</i>	<i>UBQ10</i>
Genótipo	1	0,657*	0,393*	3,651*	0,233	0,493	8,00E-005
Tempos de frio (h)	4	0,026	0,093	6,475*	0,370	2,408*	0,012
Interação	4	0,070	0,050	0,747	0,196	0,678	0,048
Resíduo	20	0,151	0,078	0,743	0,158	0,630	0,066
Total	29	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Os dados apresentados na Tabela 3 demonstram que, de acordo com os valores referentes ao Desvio Padrão totais (DP) e Coeficiente de Variação total (CV%), *β -Tubulina* e *UBQ10* apresentam os menores valores de DP total (0,27 e 0,23, respectivamente) e CV% total (24,49 e 22,756 respectivamente), indicando maior estabilidade de expressão destes genes. Neste mesmo sentido, BRUNNER et al. (2004), em estudo com plantas do gênero *Populus*, obtiveram bons resultados utilizando genes de tubulina, porém, EXPÓSITO-RODRIGUEZ et al. (2008), identificaram os genes de tubulina como os mais instáveis em estudos com *Solanum lycopersicum*. Avaliados em conjunto, estes resultados levam a sugerir que os genes constitutivos podem ser regulados de forma diferenciada em diferentes espécies de plantas ou mesmo genótipos da mesma espécie. Por outro lado, para *Eef-1 α* e *eIF-4 α* foram observados os maiores valores de DP total e de CV% total. Somado a estes resultados, foi possível inferir que há uma maior variação de expressão dos genes *ACT11*, *UBC-2*, *eIF-4 α* e *Eef-1 α* na cultivar BRS Bojuru, tolerante ao estresse por baixa temperatura (Tabela 3; Figura 1).

Tabela 3. Desvio Padrão (DP) e Coeficiente de Variação (CV%) de seis possíveis genes de referência, para as cultivares de arroz BRS Bojuru e BRS Pampa, submetidas a cinco tempos de exposição ao frio

		<i>ACT11</i>	<i>β-Tubulina</i>	<i>Eef-1α</i>	<i>UBC-E2</i>	<i>eIF-4α</i>	<i>UBQ10</i>
DP	BRS Bojuru	0,39	0,20	1,37	0,46	1,16	0,21
	BRS Pampa	0,31	0,34	1,11	0,42	0,66	0,26
Total		0,35	0,27	1,24	0,44	0,91	0,23
CV %	BRS Bojuru	33,26	15,94	48,71	35,24	62,72	20,08
	BRS Pampa	35,52	33,04	52,32	37,75	41,80	25,22
Total		34,39	24,49	50,51	36,50	52,26	22,65

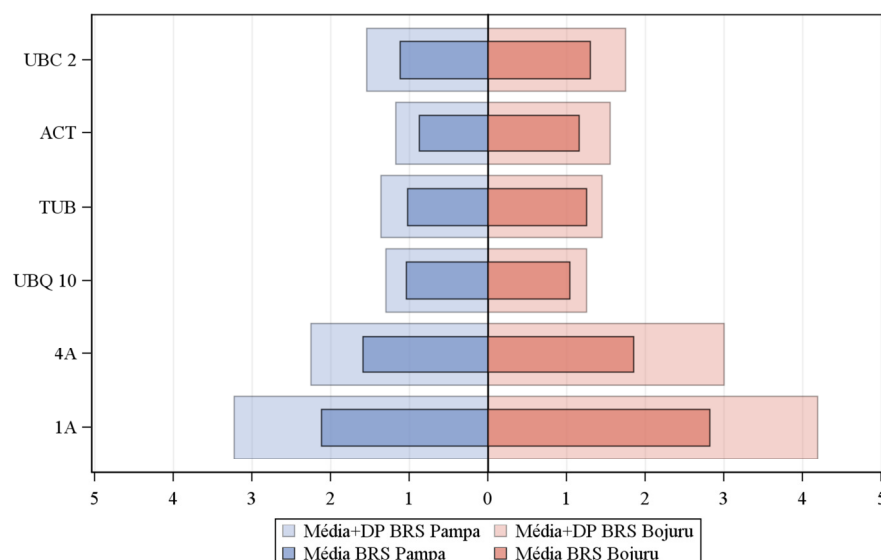


Figura 1. Quantificação relativa média e Desvio Padrão (DP) de seis possíveis genes de referência para as cultivares de arroz BRS Bojuru e BRS Pampa, submetidas a cinco tempos de exposição ao frio.

4. CONCLUSÕES

A análise de estabilidade de expressão de seis genes constitutivos para estudos de RT-QPCR, indica o gene *UBQ10* como os mais indicados para estudos com plantas de arroz expostas ao estresse por frio e os genes *eIF-4-a* e *Eef-1a* como os menos indicados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRUNNER, A.M.; YAKOVLEV, I.A.; STRAUSS, S.H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. **BMC Plant Biol.**, p. 4-14, 2004.
- CHAO, W.S.; DOGRAMACI, M.; FOLEY, M.E.; HORVATH, D.P.; ANDERSON, J.V. Selection and validation of endogenous reference genes for RT-QPCR analysis in *Euphorbia esula*. **PLoS ONE**, v.7, p.1-10, 2012.
- CRUZ, R.P.; SPEROTTO, R.A.; CARGNELUTTI, D.; ADAMSKI, J.M.; TERRA, T.F.; FETT, J.P. Avoiding damage and achieving cold tolerance in rice plants. **Food Energy Secur.**, v.2, p.96-119, 2013.
- EXPÓSITO-RODRIGUEZ, M.; BORGES, A.A.; BORGES-PÉREZ, A.; PÉREZ, J.A. Selection of internal genes control for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biol.**, p. 118-131, 2008.
- HERNANDEZ-GARCIA, C.M.; MARTINELLI, A.P.; BOUCHARD, R.A.; FINER, J.J. A soybean (*Glycine max*) polyubiquitin promoter gives Strong constitutive expression in transgenic soybean. **Plant Cell Rep.**, v.28, p.837-849, 2009.
- NOBUTA, K.; VENU, R.C.; LU, C.; BELÓ, A.; VEMARAJU, K. et al. An expression atlas of rice mRNAs and small RNAs. **Nature Biotechnology**, v.25, p.473-477, 2007.
- RABBANI, M.; MARUYAMA, K.; ABE, H.; KATSURA, K.; TOSHIWARA, K.; SHINOZAKI, H.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stress and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analysis. **Plant Physiology**, v.133, p.1755-1767, 2003.
- MORAES, G.P. **Expressão diferencial de genes normalizadores e da família *LTPs1*, em genótipos de arroz sob estresse salino**. 2013. 85f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Curso de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas.
- CONAB Arroz - Brasil. **Acompanhamento da Safra Brasileira-Grãos**: Oitavo Levantamento, Maio/2015. Acesso em: Junho de 2015. Disponível em: <www.conab.gov.br>