

## **IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS A REFERÊNCIA PARA NORMALIZAÇÃO EM RT-qPCR EM PLANTAS DE ARROZ SUBMETIDAS A DIFERENTES HERBICIDAS**

HUMBERTO DE SOUZA FARIAS<sup>1</sup>, FABRÍCIO MAZZAROLO SEGER<sup>2</sup>, GUSTAVO DAL FORNO<sup>2</sup>, DAIANE DE PINHO BENEMANN<sup>2</sup>, MARCOS ANDRÉ NOHATO<sup>2</sup>, DIRCEU AGOSTINETTO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – humbertofarias31@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas. fabri\_seger@hotmail.com, gustavodalforno@gmail.com, daiane\_bio@yahoo.com.br, marcosnohatto@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - Orientador – agostineto.d@gmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

Análise de expressão gênica é essencial para a compreensão de muitos aspectos da biologia vegetal (MARTIN et al., 2008). RT-PCR quantitativo (RT-qPCR) é atualmente uma das técnicas mais poderosas e sensíveis para a análise de expressão gênica e contribui para melhorar a compreensão da sinalização, desenvolvimento de vias metabólicas e processos celulares (PAOLACCI et al., 2009).

É provável que um ou mais genes são expressos de forma constitutiva através de órgão específico, em ambiente específico (ANDERSEN et al., 2004). Deste modo, a seleção e validação sistemática de genes de referência deve ser realizado antes de todas as análises de RT-qPCR (GUTIERREZ et al., 2008). Genes de controle interno (genes de referência) são mais comumente utilizados para normalizar RT-qPCR e para reduzir possíveis erros gerados na quantificação da expressão do gene, o qual é obtida através da comparação dos níveis de expressão em amostras analisadas do gene de interesse e de genes constitutivos de controle estável (PAOLACCI et al., 2009). Os genes escolhidos como normalizadores, geralmente, se encontram envolvidos em processos celulares básicos, como manutenção da estrutura celular e metabolismo primário (CZECHOWSKI et al., 2005).

Com o intuito de avaliar a estabilidade da 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 CT (SILVER et al., 2006). O algoritmo do programa NormFinder identifica o melhor gene normalizador entre genes candidatos com base em sua estabilidade de expressão. Este algoritmo avalia a variação total de expressão dos genes candidatos através da soma da variância (ANDERSEN et al., 2004). 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 arroz, submetidos a diferentes herbicidas.

### **2. METODOLOGIA**

Realizou-se experimento no Centro de Herbologia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (CEHERB/FAEM/UFPel), localizada no Município de Capão do Leão – RS.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial, onde o fator A foi constituído de herbicidas (penoxsulam (250 ml ha<sup>-1</sup>), bentazona (2000 ml ha<sup>-1</sup>), cialofope-butílico

(1750 ml ha<sup>-1</sup>) e testemunha sem aplicação); e, o fator B foi composto por diferentes épocas de coleta das plantas (0, 12, 24, 48 e 96 horas após a aplicação).

A aplicação dos herbicidas foi realizada aos 15 dias após a emergência (DAE) com o auxílio de pulverizador costal pressurizado com CO<sub>2</sub> munido de pontas leque 110.02, com vazão de 150 L ha<sup>-1</sup>. Um dia após a aplicação dos tratamentos, a unidade experimental foi inundada, mantendo-se lâmina de água constante de aproximadamente 5 cm de altura. A população de arroz utilizada no experimento foi de 16 plantas, com intuito de evitar o efeito da competição e obter quantidade de material suficiente para análise.

Nas épocas descritas pelo fator B, foram realizadas coletas da parte aérea do arroz, sendo armazenadas a -80°C até o momento da quantificação das variáveis.

O RNA total foi extraído das folhas do arroz cultivado com a utilização do reagente PureLinKTM (Plant RNA Reagent – InvitrogenTM), obedecendo as recomendações do fabricante. A obtenção dos cDNAs foi realizada com uso do Kit comercial SuperScript First-Strand System para RT-qPCR (InvitrogenTM), segundo recomendações do fabricante. A quantidade e qualidade dos RNAs foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 2% (p/v). A quantidade e a pureza do RNA foram determinadas utilizando espectrofotômetro NanoDropTM 2000 (Thermo Scientific), com razões 260/280 nm no intervalo de 1,9 a 2,2 e 260/230 nm em torno de 2,0, considerado como aceitável para uso em RT-qPCR.

Para os genes de referência, foram selecionados 11 genes, citados na literatura em trabalhos de arroz, utilizados como controle interno nas análises de RT-qPCR e que, supostamente não apresentaram variação significativa entre os tratamentos analisados. Os genes utilizados foram: actina (ACT), fator de alongamento de eucarioto1- $\alpha$  (Eef1 $\alpha$ ), fator de iniciação de eucarioto 4- $\alpha$  (eLF-4a), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), ubiquitina-conjugada enzima E2 (UBC-E2), ubiquitina 5 (UBQ5), ubiquitina 10 (UBQ10), RNA ribossômico 18S (18S),  $\beta$ -Tubulina, cyclophilin e aquaporina (TIP41).

Para a reação de amplificação foi utilizado volume total de 12  $\mu$ L, contendo 6,25  $\mu$ L de LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science), 0,5  $\mu$ M de primer (10mM), 1  $\mu$ L de cDNA (0,2 $\mu$ g) e água em quantidade para completar o volume final. As condições de amplificação foram de acordo com as instruções do fabricante, sistema LightCycler 480 (Roche Applied Science). Para as reações de RT-qPCR foram utilizadas triplicatas biológicas. A pureza do amplicon foi assumida quando produzido um único pico de fusão.

A eficiência da PCR foi obtida a partir de quatro diluições seriadas do pool cDNA (1:1; 1:5; 1:25 e 1:125), para gerar a curva padrão de cada par de primer testado. O valor de E foi estimado pela equação  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$  (RASMUSSEN, 2001), sendo considerados aceitáveis valores de eficiência entre 1,8 e 2,2, para os genes de referência.

A estabilidade média de expressão (M) dos genes normalizadores foi avaliada pela ferramenta RefFinder (disponível no site <http://www.leonxie.com>), a qual integra o algoritmo computacional NormFinder (VANDESOMPELE et al., 2002). Para entrada de dados no programa, foi utilizado valores de ct (número de ciclos de PCR necessários para que o sinal o fluorescente atinja o limiar de detecção) de todas as 45 amostras. Posteriormente, foram obtidas informações adicionais referentes a média (X), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) de cada gene candidato a referência.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eficiência de amplificação dos primers de referência foi calculada individualmente a partir do logaritmo (Log) das diluições de cDNA, para a cultura e a planta daninha. A diluição mais adequada para amplificação das amostras foi de 1:25, e as eficiências variaram entre 1,64 a 2,55 para arroz e 1,82 a 3,45.

Os genes endógenos ACT11, eLF4-a, UBC-E2, UBQ5, GAPDH, cyclophilin (cyclo), e 18S rRNA tiveram sua eficiência dentro do esperado (entre 1,8 e 2,2), portanto foram utilizados para o teste da estabilidade, para o mais estável ser utilizado juntamente com o gene alvo. Já, os genes  $\beta$ -Tubulina, Eef-1 $\alpha$ , UBQ10 e TIP41 apresentaram eficiência fora do esperado.

De acordo com o algoritmo do programa NormFinder o qual analisa ambas as variações intra e intergrupos, o gene candidato para arroz, que possui menor valor de M é UBQ5, com M=0,76. Os maiores valores de M ficaram com 18S (M=2,18) e GAPDH (M=2,49) (Figura 1).

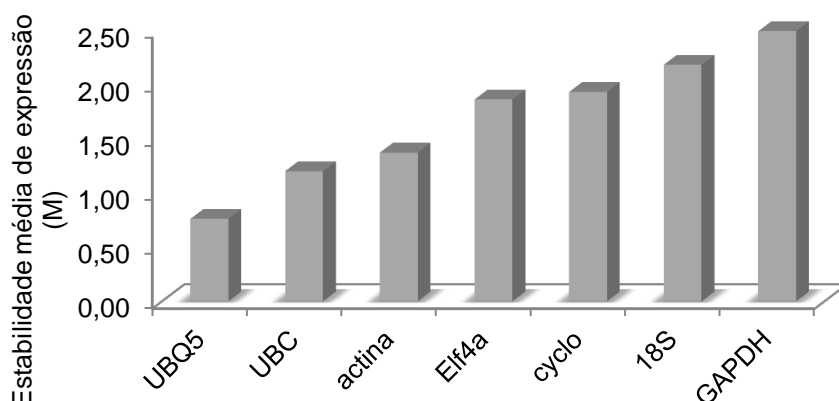


Figura 1. Estabilidade média de expressão (M) de acordo com o algoritmo Normfinder de sete genes candidatos a referência para arroz.

Para avaliar a estabilidade de expressão dos genes de referência, que apresentaram eficiência entre 1,80 e 2,20, na análise com o programa NormFinder, também foi utilizada a análise de variância, analisando os valores de média (X), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%). Foi observado que UBQ5 e UBC apresentaram menor DP e CV, indicando maior estabilidade de expressão destes genes (Tabela 1).

Tabela 1. Coeficiente de Variação (CV%), Desvio Padrão (DP) e Média geral (X) de oito genes endógenos, para a cultura do arroz (A) e para arroz-vermelho (AV) em competição.

	Actina	Cyclophilin	UBQ5	GAPDH	UBC	eLF4-a	18S
X	31,03	28,95	28,16	28,69	30,82	35,70	19,77
DP	1,49	1,47	0,91	2,30	1,26	1,38	2,52
CV	4,81	5,10	3,25	8,02	4,09	3,86	12,75

De acordo com os critérios de aceitação geral, o gene de referência mais adequado deve ser expresso de forma estável (ou com pouca variação na expressão) entre os conjuntos de amostras investigadas e ter um nível de expressão comparável à do gene alvo (ANDERSEN et al., 2004).

Com base nos resultados de eficiência, estabilidade média (NormFinder) e análise de variância, foi selecionado para o arroz, o gene normalizador UBG5. As ubiquitinas são proteínas altamente conservadas nos eucariotos e estão envolvidas em complexos de sinalização de outras proteínas (SUN et al., 1997), além de participarem na estrutura e transcrição da cromatina, na reparação de DNA, regulação da endocitose e tráfego de proteínas (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2009).

#### 4. CONCLUSÕES

O gene de referência mais estável, para a cultura do arroz submetidos a diferentes herbicidas é o ubiquitina 5 (UBQ5). A seleção do gene de referência reduzirá possíveis erros na quantificação da expressão do gene alvo.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOF, T.F. 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, p.5245–5250, 2004.

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M.K.; SCHEIBLE, W-R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in arabidopsis. **Plant Physiology**, v.139, p.5-17, 2005.

GUTIERREZ, L.; MAURIAT, M.; PELLOUX, J.; BELLINI, C.; WUYTSWINKEL, O. Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. **Plant Cell**, v.20, p.1734–1735, 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**, v.28, p.837-849, 2009.

MARTIN, R.C.; HOLLENBECK, V.G.; JAMES E. DOMBROWSKI, J.E. Evaluation of reference genes for quantitative RT-PCR in *Lolium perenne*. **Crop Science**, v.48, p.1881–1887, 2008.

PAOLACCI, A.R.; TANZARELLA, O.A.; PORCEDDU, E.; CIAFFI, M. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. **BMC Molecular Biology**, v.10, p.11-16, 2009.

SILVER, N.; BEST, S.; JIANG, J.; THEIN, S.L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v.7, p.33-42, 2006.

SUN, C.W.; GRIFFEN, S.; CALLIS, J. A model for the evolution of polyubiquitin genes from the study of *Arabidopsis thaliana* ecotypes. **Plant Molecular Biology**, v.34, p.745-758, 1997.