

VALIDAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA ESTUDOS DE RT-qPCR EM *Stevia rebaudiana* SUBMETIDAS À AÇÃO DE DIFERENTES AGENTES ELICITORES

SIMONE RIBEIRO LUCHO¹; MARCELO NOGUEIRA DO AMARAL²; LETÍCIA CARVALHO BENITEZ²; CRISTINI MILECH²; ALÍTCIA MORAES KLEINOWSKI²; EUGENIA JACIRA BOLACEL BRAGA³

¹Universidade Federal de Pelotas – simonibelmonte@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Pelotas – jacirabraga@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Stevia rebaudiana (Bert.), conhecida como stevia, é uma erva perene, pertencente à família Asteraceae, que tem sido usada durante séculos para adoçar alimentos e bebidas na América do Sul, Japão e China (GEUNS, 2003). Os componentes primários responsáveis pelas propriedades doces desta planta são os glicosídeos de esteviol (GSs) (CHATURVEDULA; PRAKASH, 2011). Além disso, a stévia tem recebido cada vez maior interesse entre os diferentes campos de pesquisa principalmente por conferir diversas propriedades medicinais (YANG et al., 2015).

Embora a biossíntese dos GSs esteja bastante elucidada, a expressão dos genes envolvidos nessa rota permanece pouco compreendida, assim como os processos fisiológicos que desencadeiam a sua maior ou menor expressão em stévia. Em razão da gama de possibilidades que esta planta oferece, estudos com a mesma se faz necessário, pois não existem na literatura dados do seu perfil transcricional quando submetidas à ação de agentes elicitores.

Para avaliar mudanças na expressão de genes, o RT-qPCR é uma das técnicas amplamente utilizadas, por causa de sua alta sensibilidade, reproduzibilidade e especificidade (DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010). A abordagem mais frequentemente utilizada para a normalização de dados de RT-qPCR, é a utilização de um ou mais genes de referência, que devem ser expressos a um nível constante em várias condições.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a estabilidade da expressão de genes de referência para serem usados em estudos de RT-qPCR em plantas de stévia submetidas à ação dos agentes elicitores Metiljasmonato, Ácido salicílico e Espermina. Para demonstrar a eficácia dos genes de referência selecionados, foi analisada a expressão de dois genes, *Deoxyxylulose-5-phosphate synthase* (*DXS*) e *Kaurenoic acid hydroxylase* (*KAH*), ambos envolvidos na biossíntese de glicosídeos de esteviol.

2. METODOLOGIA

Após 30 dias de cultivo *in vitro*, as plantas de *S. rebaudiana* foram retiradas do meio de cultura e transferidas para bandejas plásticas. A irrigação das plantas foi realizada a cada dois dias com água e a cada três dias com solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1938), meia força, até que completassem 30 dias em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16h e temperatura 25 °C ±1.

Posteriormente, estas plantas foram transferidas para um sistema hidropônico de fluxo contínuo com raízes flutuantes e cultivadas com solução nutritiva de Hoagland, meia força. O tratamento controle foi solução de Hoagland,

meia força (T1) e os demais tratamentos a mesma solução com 100 µM de MeJa (T2); 100 µM de Espermina (T3) e 100 µM de Ácido Salicílico (T4). Folhas destas plantas foram coletadas em um período de quatro dias com intervalos de 24 horas e denominadas, C1, C2, C3, C4.

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de folhas de acordo com o protocolo do fabricante (*Plant RNA Reagent Purilink®*, EUA). E os cDNAs de cadeia simples foram sintetizados por transcrição reversa utilizando o kit oligo-dTSuper Script First-Strand Synthesis System para RT-PCR (*Invitrogen®-18080093*, EUA).

Sete genes candidatos à referência foram testados no presente estudo, sendo *ACT*, *UBQ* e *18S* já utilizados em trabalhos com *Stevia rebaudiana* (HAJIHASHEMI; GEUNS; EHSANPOUR, 2013), *MAL* e *EeF-1a* (MORAES et al., 2015) tradicionalmente usados em outras espécies e novos candidatos como *CALM* e *AQP*. As reações de qRT-PCR foram realizadas em Termociclador Bio-Rad CFX Real Time, utilizando o kit FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Hoffmann–La Roche®). Para a estimativa da estabilidade dos candidatos a gene de referência, a ferramenta RefFinder (<http://fulxie.0fees.us/>) foi utilizada.

Para confirmar a confiabilidade dos potenciais genes de referência, o perfil de expressão de *DXS* (*Deoxyxylulose-5-phosphate synthase*) e *KAH* (*Kaurenoic acid hydroxylase*), duas enzimas envolvidas na biossíntese de glicosídeos de esteviol, foram quantificados e normalizados com os dois genes mais estáveis e menos estáveis.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 4x4, sendo três agentes elicitores e o controle (sem elicitação) e quatro tempos de exposição aos agentes elicitores. Para cada combinação foram realizadas três repetições biológicas, sendo que cada repetição foi composta por um pote contendo cinco plantas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O software RefFinder utiliza o valor de Cq para atribuir valores para um gene individual e calcula a média geométrica destes valores realizando um ranqueamento final. Portanto, nós utilizamos o RefFinder para confirmar quais os genes que apresentaram maior estabilidade nas condições experimentais avaliadas. De acordo com a Figura 1A, o ranking de estabilidade foi *ACT>UBQ>AQP>EeF-1a>MAL>18S>CALM*, quando todos os tratamentos foram analisados em conjunto.

Considerando o nível de estabilidade dos genes candidatos à referência separadamente, quando utilizado o agente elicitador MeJa, o ranking geral de acordo com RefFinder foi: *ACT>UBQ>MAL>Eef-1a>AQP>18S>CALM*. Os genes com maior instabilidade se mantiveram quando utilizado o elicitador Espermina, entretanto AQP apresentou maior estabilidade, seguido pela ACT. Para o elicitador ácido salicílico, os genes *UBQ* e *ACT* permaneceram como os mais estáveis, entretanto além do gene *CALM*, *MAL* também demonstrou alta instabilidade.

Embora vários genes sejam costumeiramente utilizados e relatados como bons normalizadores (LANDI; FELIZIANI; ROMANAZZI, 2014) as condições experimentais avaliadas neste estudo interferiram no nível de estabilidade dos genes candidatos a referência, demonstrando a importância destes estudos.

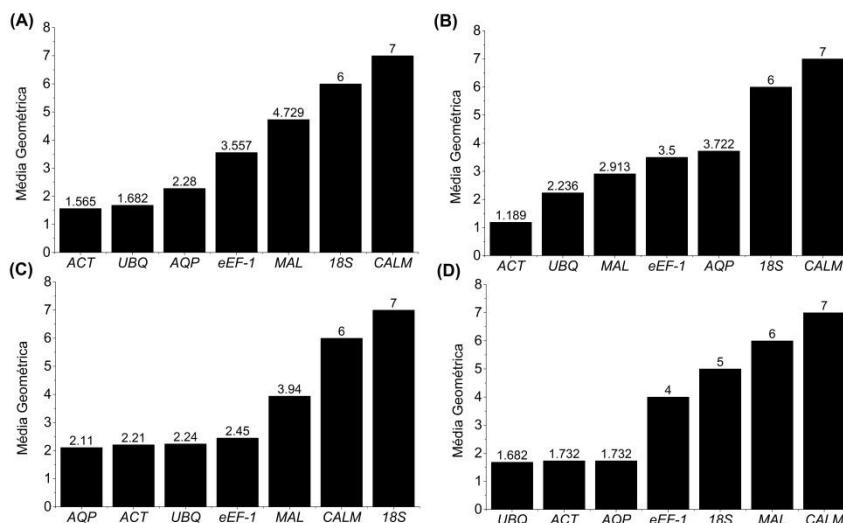


Figura 1-Média geométrica de genes candidatos à referência em *Stevia rebaudiana* calculado pelo método RefFinder. (A) análise dos três elicitores em conjunto, (B) Metiljasmonato, (C) Espermina (D) Ácido Salicílico.

Para detectar o efeito de diferentes genes de referência na normalização de dados, avaliamos a expressão relativa dos genes *DXS* e *KAH* utilizando os melhores (*ACT* e *UBQ*) e os piores (*18S* e *CALM*) genes de referência. Avaliando a expressão do gene *DXS* para o tratamento com o elicitador MeJa foi observada uma variação em todos os tempos de coleta, principalmente na C3, variando 6,5 vezes dependendo da combinação de normalizadores utilizados. Essa variação também fica evidente para os elicitores AS e SP, principalmente na C4. O resultado para o gene *KAH* no tratamento com o elicitador MeJa foi semelhante ao anterior, onde a maior diferença ocorreu na C3. Entretanto, para os elicitores AS e SP houve diferença principalmente nas C1 e C4 (Figura 2).

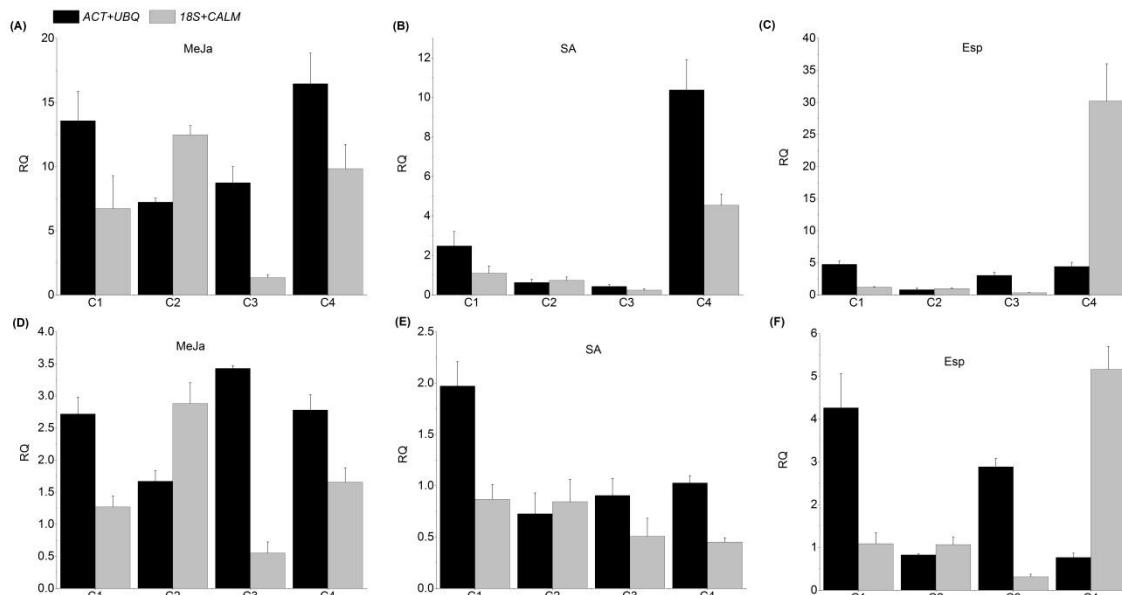


Figura 2- Perfil transcracional dos genes *DXS* (A, B e C) e *KAH* (D, E e F) em plantas de *Stevia rebaudiana* submetidas à ação de MetilJasmonato, Ácido Salicílico e Espermina, respectivamente, nos quatro tempos de coleta, utilizando a combinação dos dois genes de referência mais estáveis (*ACT* e *UBQ*) e dos dois menos estáveis (*18S* e *CALM*).

4. CONCLUSÕES

O estudo demonstra que *ACT* e *UBQ* podem ser usados como genes normalizadores em todos os tratamentos testados, e adicionalmente o gene *AQP* quando utilizado o Ácido Salicílico e Espermina. Por outro lado, os genes *18S* e *CALM* não apresentam estabilidade de expressão, não sendo indicados neste estudo. A análise de expressão de *DXS* e *KAH* confirma a importância de validar genes de referência para atingir resultados precisos em RT-qPCR. Este trabalho é de grande relevância para posteriores análises de expressão gênica dos compostos bioativos presentes em *Stevia rebaudiana*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHATURVEDULA, V. S. P.; PRAKASH, I. A new diterpene glycoside from Stevia rebaudiana. **Molecules**, v. 16, n. 4, p. 2937–2943, 2011.
- DERVEAUX, S.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 227–230, 2010.
- GEUNS, J. M. C. Stevioside. **Phytochemistry**, v. 64, p. 913-921, 2003.
- HAJIHASHEMI, S.; GEUNS, J. M. C.; EHSANPOUR, A. A. Gene transcription of steviol glycoside biosynthesis in Stevia rebaudiana Bertoni under polyethylene glycol, pacllobutrazol and gibberellic acid treatments in vitro. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 6, p. 2009–2014, 2013.
- HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricult. Experimen**, v.347, 1938.
- LANDI, L.; FELIZIANI, E.; ROMANAZZI, G. Expression of defense genes in strawberry fruits treated with different resistance inducers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 14, p. 3047–3056, 2014.
- MORAES, G. P. et al. Evaluation of reference genes for RT-qPCR studies in the leaves of rice seedlings under salt stress. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 2384–2398, 2015.
- YANG, Y. et al. Environmental cues induce changes of steviol glycosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in Stevia rebaudiana. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 86, p. 174–180, 2015.