

SELEÇÃO E VALIDAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA EM RAÍZES DE PORTA-ENXERTOS DE *Prunus* spp. SOB ESTRESSE POR ALAGAMENTO DO SOLO

ELSA KUHN KLUMB¹; JOSIANE ESTELA ROLOFF²; VALMOR JOÃO BIANCHI³

¹Universidade Federal de Pelotas, Doutoranda PPGFV – elsakk91@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas, Bolsista IC CNPq – josianeestelarloff.5@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas, Prof. Associado – valmorjb@yahoo.com

1. INTRODUÇÃO

O alagamento do solo é de ocorrência natural podendo ser causado por excesso de chuvas associado as características dos solos (SASIDHARAN et al., 2015). Na região Sul do Rio Grande do Sul, principal zona de produção de pêssegos do Brasil, o estresse hídrico por seca e alagamento é comum na grande maioria dos anos, fato que somado a outros fatores tem sido associado à baixa produtividade média dos pomares desta região.

O alagamento do solo propicia condições de baixa disponibilidade de oxigênio para o sistema radicular, afetando negativamente o funcionamento, crescimento e desenvolvimento tanto da raiz quanto da parte aérea (KREUZWIESER; RENNENBERG, 2014; LORETI et al., 2016), levando a uma crise energética celular devido a baixa disponibilidade ou ausência de oxigênio no sistema radicular (SHINGAKI-WELLS et al., 2014). Essa condição afeta toda a fisiologia da planta, ativando a via fermentativa, comprometendo a qualidade dos frutos, o rendimento dos pomares, podendo levar as plantas a morte.

A tolerância das frutíferas de caroço ao estresse por alagamento se deve a adaptabilidade do porta-enxerto que é responsável pela absorção de água e nutrientes. Os genótipos de pessegueiro de maneira geral são suscetíveis ao estresse por alagamento, entretanto existe variabilidade genética para a tolerância dentro do gênero *Prunus*. A identificação de genótipos tolerantes a tal condição de estresse, bem como o entendimento sobre os fatores fisiológicos e celulares que são alterados sob tais condições é de grande importância. A técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) é uma técnica que permite a análise de expressão gênica sob diferentes condições do ambiente (DERVEAUX et al., 2010), entretanto, uma etapa inicial para realização desse tipo de estudo é a seleção e validação de genes de normalizadores para posterior estudo da expressão de genes alvo.

O objetivo desse estudo foi identificar genes de referência adequados para normalização de dados expressão gênica em raízes dos porta-enxertos de *Prunus* spp. 'Capdeboscq' e 'Mirabolano 29-C', sob estresse por alagamento do solo.

2. METODOLOGIA

O estudo foi executado no Laboratório de Fisiologia Molecular do Departamento de Botânica da UFPEL. Como material vegetal foram utilizadas plantas de pessegueiro cv. Capdeboscq e de ameixeira cv. Mirabolano 29-C, com 10 meses de idade, obtidas por estaquia, sendo cultivadas em casa de vegetação, em vasos de 5 litros contendo solo classificado com vermelho-amarelo distrófico. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado para cada genótipo. As coletas de raízes foram nos tempos zero (controle), 6, 12, 24, 48, 72, 120 e 192 horas de estresse por

alagamento. Para cada tratamento foram utilizadas três repetições biológicas. As amostras coletadas foram armazenadas em ultrafreezer até a extração do RNA.

Para a extração do RNA total foi utilizado o método de precipitação por Cloreto de Lítio modificado por CHANG et al. (1993). A integridade do RNA total foi verificada em gel de agarose a 1% e a quantidade e pureza mensurada em NanoDrop ND-1000® (GE Healthcare™). Os cDNAs foram sintetizados a partir de 1,5 µg de RNA total, utilizando o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

Os *primers* para uso na análise de expressão dos genes de referência foram: *PLA2* (fosfolipase A2), *CYP2* (ciclofilina 2), *Ef1α* (fator de alongamento 1-alfa), *RPL13* (proteína ribossômica L13), *TUA* (alfa tubulina), *TUB* (beta tubulina), *RPII* (RNA polimerase II) e *18S RNA* (RNA ribossômico 18S) (XU et al., 2008; TONG et al., 2009). As reações de RT-qPCR foram feitas com o uso do fluoróforo SYBR Green (Invitrogen®) e a amplificação em equipamento CFX-96 Real Time Thermal Cycler (Bio-Rad), com três repetições biológicas para cada tratamento.

Para avaliação dos genes de referência foi utilizada a ferramenta online RefFinder. Ele integra os principais programas computacionais atualmente disponíveis (CT, BestKeeper, Normfinder e GeNorm) para comparar e classificar os genes de referência testados. Para a validação dos dados foram utilizados os genes alvo da *ADH1* (Álcool Desidrogenase 1) e *LDH1* (Lactato Desidrogenase 1), associados ao metabolismo fermentativo. Os dados da expressão relativa foram calculados de acordo com o método 2^{-Q_c} (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A principal característica de um gene de referência em estudos de RT-qPCR é a estabilidade da expressão entre diferentes condições de cultivo, fisiológicas, períodos de desenvolvimento e tecidos. Para 'Capdeboscq' os genes mais estáveis foram *RPII* e *EF1α*, enquanto que o gene menos estável foi o da *TUB* (Tabela 1). Para 'Mirabolano 29-C', o RefFinder indicou os genes *RPII* e *CYP2* como os mais recomendados para estudos de RT-qPCR. E o gene menos estável *EF1α* (Tabela 1).

Na validação dos genes adequados para uso como referência, realizou-se a quantificação relativa da expressão (RQ) de dois genes alvo codificadores das enzimas *LDH1* e *ADH1*, fazendo uso dos dois genes mais indicados e menos indicados como normalizadores para os dois genótipos estudados.

Em 'Capdeboscq' o uso de genes não indicados para normalização promoveu um aumento na expressão em praticamente todos os tempos, principalmente de *LDH1*, o qual aparece como *up-regulated* as 48h, 120h e 192h de estresse por alagamento (Figura 1 B), enquanto com os melhores normalizadores, estes tempos apareceram como *down-regulated* (Figura 1 A). Na validação de 'Mirabolano 29-C', o uso de genes não indicados como normalizadores para esta condição e cultivar aumentaram de modo considerável o RQ de *LDH1* e *ADH1* em cada um dos tempos avaliados neste estudo (Figura 1 B e D), enquanto que com o uso dos genes mais indicados ocorreu estabilidade nos níveis de expressão (Figura A e C). Tais resultados evidenciam a necessidade de estudos prévios para identificação dos melhores genes de referência, a fim de evitar a interpretação errônea dos dados de expressão em RT-qPCR, conforme proposto por PAOLACCI et al. (2009).

Tabela 1. Estabilidade de expressão de oito genes de referência de acordo com os algoritmos comparativos ΔCt , BestKeeper, NormFinder, geNorm e RefFinder em raízes de 'Capdeboscq' e 'Mirabolano 29-C' sob alagamento do solo.

Classificação	ΔCt	BestKeeper	NormFinder	GeNorm	RefFinder
Capdeboscq	1 <i>RPII</i>	<i>TUA</i>	<i>RPII</i>	<i>EF1α</i> / <i>PLA2</i>	<i>RPII</i>
	2 <i>TUA</i>	<i>18S</i>	<i>EF1α</i>	<i>RPII</i>	<i>EF1α</i>
	3 <i>EF1α</i>	<i>CYP2</i>	<i>TUA</i>	<i>RPL13</i>	<i>TUA</i>
	4 <i>PLA2</i>	<i>RPII</i>	<i>PLA2</i>	<i>TUA</i>	<i>PLA2</i>
	5 <i>RPL13</i>	<i>EF1α</i>	<i>RPL13</i>	<i>18S</i>	<i>18S</i>
	6 <i>18S</i>	<i>PLA2</i>	<i>18S</i>	<i>CYP2</i>	<i>RPL13</i>
	7 <i>CYP2</i>	<i>RPL13</i>	<i>CYP2</i>	<i>TUB</i>	<i>CYP2</i>
	8 <i>TUB</i>	<i>TUB</i>	<i>TUB</i>	-	<i>TUB</i>
Mirabolano 29-C	1 <i>RPII</i>	<i>PLA2</i>	<i>RPII</i>	<i>CYP2</i> / <i>RPII</i>	<i>RPII</i>
	2 <i>CYP2</i>	<i>18S</i>	<i>CYP2</i>	<i>RPL13</i>	<i>CYP2</i>
	3 <i>RPL13</i>	<i>CYP2</i>	<i>RPL13</i>	<i>TUB</i>	<i>RPL13</i>
	4 <i>18S</i>	<i>RPL13</i>	<i>18S</i>	<i>18S</i>	<i>PLA2</i>
	5 <i>PLA2</i>	<i>RPII</i>	<i>PLA2</i>	<i>PLA2</i>	<i>18S</i>
	6 <i>TUB</i>	<i>TUB</i>	<i>TUB</i>	<i>TUA</i>	<i>TUB</i>
	7 <i>TUA</i>	<i>TUA</i>	<i>TUA</i>	<i>EF1α</i>	<i>TUA</i>
	8 <i>EF1α</i>	<i>EF1α</i>	<i>EF1α</i>	-	<i>EF1α</i>

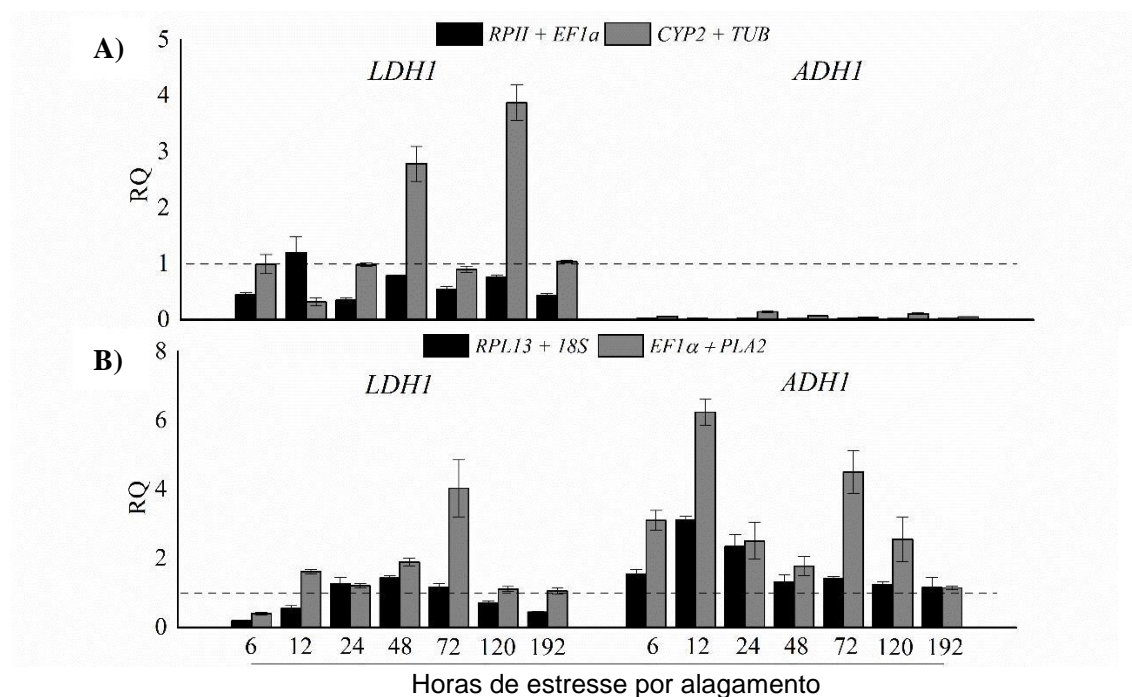


Figura 1. Quantificação relativa (RQ) dos genes *LDH1* e *ADH1* em raízes de 'Capdeboscq' (A) e 'Mirabolano 29-C' (B) submetidas ao alagamento do solo. A combinação dos dois genes mais adequados para cada cultivar (*RPII*/*EF1 α* e *RPL13*/*18S*) é mostrada em preto, enquanto os genes de referência menos adequados (*CYP2*/*TUB* e *EF1 α* /*PLA2*) são mostrados em cinza. A linha tracejada representa o valor RQ das amostras controle. Os dados mostram a média de expressão e o erro padrão calculado com base em três repetições biológicas.

O uso de genes de referência como controles internos para normalizar os níveis de mRNA é uma exigência da análise de RT-qPCR, afim de remover a variação da técnica e minimizar mudanças biológicas (DERVEAUX et al., 2010). O gene *CYP*, mais estável para 'Mirabolano 29-C', está relacionado com a transcrição, resposta imune, modulação da permeabilidade mitocondrial, conformação de proteínas e morte celular (KONG et al., 2015). O gene *RPII*, estável tanto para 'Capdeboscq' como 'Mirabolano' 29-C, é responsável pela expressão de uma subunidade da RNA polimerase II, portanto são genes de referência indicados normalizar a expressão de genes alvo em raízes destas duas cultivares sobre estresse por alagamento.

4. CONCLUSÕES

- *CYP2* e *RPII* apresentam maior estabilidade e *Ef1α* se demonstrou instável para 'Mirabolano 29-C'.
- *RPII* e *EF1α* são mais estáveis para 'Capdeboscq', enquanto *TUB* se demonstrou instável.
- Os dados de expressão de *LDH1* e *ADH1* corrobora a importância do uso de genes normalizadores mais estáveis para evitar erros na análise de RT-qPCR.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DERVEAUX, S.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, Nova York, v.50, p.227-230, 2010.
- KONG, G.; ZHAO, Y.; JING, M.; HUANG, J.; YANG, J.; XIA, Y.; KONG, L.; YE, W.; XIONG, Q.; QIAO, Y.; DONG, S.; MA, W.; WANG, Y. The activation of *Phytophthora* effector Avr3b by plant cyclophilin is required for the nudix hydrolase activity of Avr3b. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v.11, p.e1005139, 2015.
- KREUZWIESER, J.; RENNENBERG, H. Molecular and physiological responses of trees to waterlogging stress. **Plant, Cell and Environment**, Nova Jersey, v.10, n.1, p.2245-2259, 2014.
- LIVAK K. J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(- C(T)) Method. **Methods**, Nova York, v.25, p.402-408, 2001.
- LORETI, E.; VEEN, H.V.; PERATA, P. Plant responses to flooding stress. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v.33, p.64-71, 2016.
- PAOLACCI, A.E.; TANZARELLA, O.A.; PORCEDDU, E.; CIAFFI, M. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. **BMC Molecular Biology**, Londres, p.10-11, 2009.
- SASIDHARAN, R.; VOESENEK, L.A.C.J. Ethylene-Mediated Acclimations to Flooding Stress. **Plant Physiology**, Monona, v.169, p.3-12, 2015.
- SHINGAKI-WELLS, R.; MILLAR, A.H.; WHELAN, J.; NARSAI, R. What happens to plant mitochondria under low oxygen? An omics review of the responses to low oxygen and re-oxygenation. **Plant, Cell and Environmental**, Nova Jersey, n.37, v.10, p.2260-2277, 2014.
- TONG, Z.; GAO, Z.; WANG, F.; ZHOU, J.; ZHANG, Z. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using realtime PCR. **BMC Molecular Biology**, Londres, v.71, p.1-13, 2009.
- XU, Y.; ZHANG, L.; XIE, H.; ZHANG, Y.; OLIVEIRA, M. M; MA, R. Expression Analysis and genetic mapping of three SEPALLATA-like genes from peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). **Tree Genetics and Genomes**, Heidelberg, v.4, p.693-703, 2008.