

Análise da estabilidade do gene de referência *OsEF1- α* em diferentes estresses abióticos

Fabiane Igansi de Castro dos Santos¹; Vivian Ebeling Viana²; Naciele Marini³; Ariadne Ribeiro Henriques⁴; Antonio Costa de Oliveira⁵;

Palavras-chave: normalizador, submergência, toxidez por ferro, transcrição

INTRODUÇÃO

O arroz é um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional, fornece 20% de energia necessária ao organismo humano, ainda, destacando sua importância o Brasil é o 9º maior produtor mundial e a região sul produz 60% do arroz brasileiro (CONAB, 2014). Atualmente tem se buscado cultivares altamente produtivas e tolerantes a estresses bióticos e abióticos tendo em vista as alterações climáticas que vem ocorrendo causando uma importante influência na segurança alimentar em todo o mundo. Um dos estresses que poderá ser causado por estas mudanças é o estresse por inundação. O excesso de água fornece restrições para o cultivo do arroz em solos de várzea. A submergência de curto prazo (*flash floods*) por mais de duas semanas podem causar sérias perdas nos campos de arroz independentemente do estágio de desenvolvimento do vegetal (IRRI, 2014).

Além disso, outros estresses estão relacionados as perdas do arroz a campo, como é o caso a toxidez por excesso de ferro. A inundação do solo, requerida para o sistema irrigado, somado a principal característica de solos hidromórficos os quais possuem drenagem deficiente, torna o ambiente hipóxico, alterando o pH. Esta alteração de pH promove a redução de óxidos férricos (Fe^{3+}) a óxidos ferrosos (Fe^{2+}) com consequente elevação da solubilidade e disponibilidade do íon, o que causa diversos problemas na planta relacionados a toxidez (SCHIMIDT et al. 2013). Frente a estes fatores limitantes ao cultivo vegetal, as plantas tem desenvolvido mecanismos intrínsecos em diferentes aspectos, tais como a nível estrutural, celular e molecular (CHEN et al. 2012).

O estudo em direção ao entendimento destes mecanismos de adaptação pode ser facilitado verificando a expressão de genes envolvidos nesta resposta ao estresse, fornecendo assim, ferramentas para os programas de melhoramento genético. A técnica de qRT-PCR é muito utilizada para a quantificação da expressão gênica e permite comparar padrões de transcrição genica em diferentes situações experimentais (VANGUIDER et al. 2008; PONTON et al. 2011). A normalização dos níveis de expressão de genes alvo é um dos principais requisitos nestes ensaios já que, os níveis de expressão de genes alvo são calculados em relação a controles endógenos. Sendo assim a seleção de um gene de referência com expressão estável é uma etapa crítica no sentido de controlar a variabilidade entre as amostras (DHEDA et al. 2004). Com o intuito de selecionar genes de referência com expressão estável, este trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade do gene *OsEF1- α* (*elongation factor 1- α*) para ser utilizado na normalização da expressão de genes alvo responsivos ao estresse por submergência e excesso de ferro em diferentes tecidos de plântulas de arroz.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório do Centro de Genômica e Fitomelhoramento, pertencente ao departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da

¹ Msc. em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, CP. 354, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: santosfic@hotmail.com

² Msc. em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas

³ Dra. em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas.

⁴ Dra. em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas.

⁵ Prof. PhD. em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas.

Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Foram utilizadas sementes de arroz irrigado da cultivar Nipponbare, estas foram alocadas em caixas gerbox com papel germitest e colocadas para germinar em câmara de germinação (B.O.D.) a 25°C, fotoperíodo de 16 horas/8 horas (luz/escuro) e umidade relativa de 100% por 7 dias, seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado com três repetições, sendo cada unidade experimental composta por cinco plântulas.

Para a indução de estresse por ferro, plântulas uniformes foram transferidas para tela de nylon adaptada à tampa de um recipiente com capacidade para 4 L contendo solução nutritiva de YOSHIDA (1976). Os recipientes foram acondicionados em um tanque hidropônico, com água a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas, e aeração permanente. A solução nutritiva foi trocada a cada sete dias. As plântulas se desenvolveram nessas condições por 14 dias, quando a plântula está no estágio de desenvolvimento V3. Foi então realizada a primeira coleta das plântulas no tratamento controle, sem estresse por toxidez por ferro. Ao restante dos recipientes as plântulas foram submetidas ao estresse por ferro sendo transferidas para recipientes contendo a solução nutritiva padrão mais 500mg de sulfato de ferro e permaneceram sob estas condições por 12 e 24 horas, até a coleta. O pH foi aferido diariamente. Para a indução de estresse por submergência as plântulas foram transferidas para recipientes com capacidade para 2L, acondicionados em ambiente com fotoperíodo de 16 horas/8 horas (luz/escuro), estes recipientes continham areia e foram regados 2 vezes ao dia com água e solução nutritiva de YOSHIDA (1976). As plantas permaneceram nestas condições por 7 dias. Logo após, os 14 dias, estágio de desenvolvimento V3, foi realizada a primeira coleta das plântulas submetidas ao tratamento controle (0h- sem estresse por hipoxia). O restante dos recipientes com as plântulas foram submetidas aos tratamentos de estresse, ou seja, as plântulas permaneceram sob condição de submergência por 12 e 24 horas, até a coleta. As amostras de parte aérea e raiz, obtidas na indução dos estresses de submergência e excesso de ferro, foram coletadas e acondicionadas em ultra freezer a -80°C até a realização da extração de RNA.

As extrações de RNA foram realizadas em triplicatas biológicas e segundo o protocolo do reagente TRIzol® (Invitrogen, Califórnia, USA). Para a síntese do cDNA, as amostras de RNA foram tratadas com DNaseI (Invitrogen TM®) para eliminação de contaminação com DNA genômico. Os cDNAs fita simples foram obtidos a partir de 2µg de RNA total, utilizando o kit SuperScript™III First-Strand System for qRT-PCR (InvitrogenTM). Os inicializadores foram desenhados através do programa Applied Biosystems Primer Express®. Para o qRT-PCR foi utilizado 12,5 µl do kit FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Applied Science®) e as reações foram realizadas no termociclador ABI PRISM 7500 Fast (Applied Biosystems®) com três repetições biológicas e três repetições técnicas. A quantificação relativa do gene *OsEF1-α* foi realizado segundo Braga et al. (2015). Os dados também foram analisados através de ferramentas do programa Mult Experiment Viewer (TIGR MeV).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para analisar a estabilidade do perfil de expressão do gene de referência *OsEF1-α* sob estresse, tecidos de parte aérea e raiz foram analisados. Podemos observar que no tecido de parte aérea (Figura 1A) não houve alterações na quantificação relativa de transcritos nos estresses de submergência e excesso de ferro bem como entre os tratamentos aplicados. Os dados sugerem que não houve alterações na estabilidade de expressão do gene *OsEF1-α* indicando eficiência como normalizador para o uso no tecido de parte aérea.

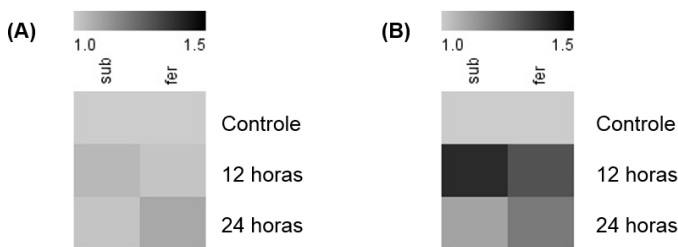


Figura 1. Perfil de expressão do gene constitutivo *OsEF1-α* analisado nos estresses de submersão e excesso de ferro nos tratamentos controle e 12 e 24 horas sob estresse, na parte aérea e raízes de plântulas de arroz irrigado do genótipo Nipponbare através da técnica de qRT-PCR e representado por escalas que variam de 1 – 1.5, utilizando o Mult Experiment Viewer (TIGR MeV). Uma extremidade da escala representada pela cor cinza claro indica menor nível de expressão do gene e a outra extremidade representada pela cor preta indica o maior nível de expressão. CGF/FAEM/UFPel, 2015. (A) perfil de expressão do gene *OsEF1-α* no tecido de parte aérea. (B) perfil de expressão do gene *OsEF1-α* em raízes.

O perfil de expressão do gene *OsEF1-α* no tecido radicular (Figura1B) não manteve a mesma estabilidade constatada na parte aérea. Neste caso é possível verificar que principalmente no tratamento de 12 horas, sob os estresses de submersão e excesso de ferro, ocorre uma alteração na quantificação relativa do número de transcritos. Entretanto a variação na quantificação relativa não invalida o uso do gene em tecidos radiculares uma vez que os valores de estabilidade mantêm-se baixos. Embora o gene de controle interno *OsEF1-α* venha sendo utilizado frequentemente como gene de referência por apresentar estabilidade, os resultados desse estudo reforçam a necessidade de validar genes de referência para diferentes tipos de tecidos mesmo quando submetidos as mesmas condições experimentais.

CONCLUSÃO

O gene *OsEF1-α* apresentou estabilidade como gene de referência nos estresses de submersão e excesso de ferro bem como para os tecidos de parte aérea e raiz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CONAB: **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 02 de novembro de 2014.
- CHEN, L.; SONG, Y.; LI, S.; ZHANG, L.; ZOU, C.; YU, D. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1819, p.120 –128, 2012.
- DHEDA K, HUGGETT JF, BUSTIN SA, JOHNSON MA, TORRE G, ZUMLA A: Validação de genes de limpeza para normalizar a expressão do RNA em PCR em tempo real. **Biotécnicas**, PubMed; v.37, p.12-119, 2004.
- IRRI – International Rice Research Institute. Disponível em <http://irri.org/>. Acesso em 22 janeiro 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, p2384-2398, 2015.
- PONTON F et al.: **Insect Physiology**, v.57. n.6, p.840 - 50, 2011.
- VANGUILDER HD, et al.: Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, 44, 619–626, 2008.
- YOSHIDA, S. et al.: Laboratory manual for physiological studies of rice. Los Baños: IRRI, 1976.

