

Análise de genes candidatos a gene de referência para estudos de expressão gênica em arroz sobre estresse por excesso de ferro

Fabiane Igansi de Castro dos Santos¹; Naciele Marini²; Marcio Alves-Ferreira³; Antonio Costa de Oliveira⁴; Vivian Ebeling Viana⁵; Ariadne Henriques⁶

Palavras-chave: (RT-qPCR, gene constitutivo, *Oryza sativa* L, estresse abiótico, toxidez por ferro)

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos alimentos mais importantes da dieta do ser humano, servindo como alimento básico para mais da metade da população mundial (IRRI, 2014). Nos últimos anos apresentou um aumento significativo na produção, atingindo no Brasil aproximadamente 12 milhões de toneladas na safra 2013/14, destacando o estado do Rio Grande do Sul como maior produtor, com uma produção de aproximadamente 8.000 milhões de toneladas (CONAB, 2014), no entanto diversos fatores limitam a produção mundial de arroz, onde podemos destacar os estresses bióticos e abióticos como responsáveis por grande parte da redução da produtividade e da qualidade da produção agrícola (SANTOS, 2012).

Entre os estresses abióticos a toxidez por ferro é um dos mais importantes (DOBERMANN, 2000), podendo levar a perdas consideráveis na produção, dependendo do nível da toxidez e da tolerância das cultivares de arroz (BENCKISER, 1982). No Brasil essas perdas podem reduzir em até 80% a produção (BACHA, 1993). A inundação do solo, como requer o sistema irrigado, somado à principal característica de solos do tipo hidromórfico, com drenagem natural deficiente, torna o ambiente hipóxico ocasionando alterações no pH, promovendo a redução de óxidos férricos (Fe^{3+}) a óxidos ferrosos (Fe^{2+}), com conseqüente elevação da solubilidade e disponibilidade do íon, podendo acarretar em graves problemas de toxidez para as plantas de arroz cultivadas neste ambiente (SCHMIDT, 2013).

Os estudos sobre a expressão dos genes envolvidos neste estresse podem contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos das plantas submetidas ao excesso de ferro e também poderá fornecer ferramentas para que estas informações sejam utilizadas em programas de melhoramento, para isso a técnica de RT-qPCR (*Quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction*) vem sendo destacada como uma das mais importantes ferramentas da era genômica, utilizada em análises para a quantificação da expressão de mRNA (VANGUILDER, 2008). Esta abordagem compara padrões de transcrição gênica em diferentes situações experimentais, no sentido de identificar caminhos moleculares envolvidos em uma infinidade de processos (PONTON, 2011).

Um dos requisitos para ensaios de RT-qPCR confiáveis é a normalização dos níveis de expressão de genes alvo (PFAFFL, 2004). Os níveis de expressão destes genes alvo são calculados com base em controles endógenos. Sendo assim, o primeiro passo, para estudos de expressão de genes realizados com RT-qPCR, é selecionar e validar os genes de referência para normalizar os diferentes níveis de genes alvo. Estes genes de referência são usados para controlar as variações na quantidade e qualidade do RNA (PONTON, 2011) e deve ser expresso em nível constante em diferentes condições, tais como estádios de desenvolvimento ou tipos de tecidos.

1 Msc. em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Caixa Postal 354, E-mail: santosfic@hotmail.com

2 Dra em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas.

3 Prof. Dr. em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

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

5 Msc. em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas.

6 Dra em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas.

Estudos anteriores demonstraram que resultados imprecisos podem ocorrer quando genes de referência são arbitrariamente utilizados para normalização interna, tornando importante o estudo de genes de referência (MATTA, 2011), pois não foram encontrados trabalhos validando estes genes de referência para estudos de expressão gênica em plantas de arroz sobre estresse por excesso de ferro. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade da expressão de cinco candidatos a genes de referência para serem utilizados na normalização da expressão de genes alvo responsivos ao estresse por excesso de ferro em tecidos de parte aérea de cultivares de arroz contrastantes.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório do Centro de Genômica e Fitomelhoramento, da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Foram utilizadas sementes de arroz irrigado das cultivares Nipponbare (subespécie *japonica*), BR Irga 409 e Epagri 108 (subespécie *indica*), 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/8horas (luz/escuro) e umidade relativa de 100% por sete 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 recipiente com capacidade para 4L contendo solução nutritiva de YOSHIDA (1976) e acondicionados em 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. O pH foi aferido e mantido com MES monohydrate: 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid hydrate. Após 14 dias, foi feita a primeira coleta da parte aérea das plântulas no tratamento controle (sem estresse). Ao restante dos recipientes as plântulas foram submetidas ao estresse por excesso de ferro, com solução nutritiva padrão mais 500mg de sulfato de ferro e permaneceram sob estas condições por 12, 24 e 36 horas, até a coleta. O pH foi aferido e mantido com MES monohydrate: 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid hydrate. As amostras coletadas foram acondicionadas em ultra freezer a -80°C até a extração de RNA.

As extrações de RNA foram realizadas em triplicatas biológicas de acordo com o protocolo do reagente TRIzol® (Invitrogen, Califórnia, USA). O cDNA foi obtido utilizando o kit SuperScript™III First-Strand System for qRT-PCR (Invitrogen™). Foram escolhidos cinco genes a partir de trabalhos anteriores. Os iniciadores foram desenhados através do programa Applied Biosystems Primer Express®. Os dados de expressão do gene constitutivo. As medidas dos produtos de amplificação foram realizadas pela incorporação do marcador fluorescente SYBR Green na dupla fita de DNA.

Para avaliação da eficiência do iniciador foi utilizado o programa online *Real-time PCR Miner* (ZHAO, 2005), que estima para cada gene os valores de eficiência das ampliações e o ponto de corte CT (*Cycle threshold*) sem a necessidade de uma curva padrão a partir de um algoritmo de regressão não linear.

Os valores de CT gerados pelo *Miner* foram utilizados no programa *qBase*, versão v 1.3.5 (HELLEMANS, 2007) que emprega o modelo de quantificação relativa ΔCT para transformar o valor de expressão em valores relativos não-normalizados, corrigidos pela eficiência da PCR através da fórmula $Q = E^{-\Delta\text{CT}}$, onde E é a eficiência do gene e ΔCT é a amostra com menor valor de expressão menos o valor de expressão em questão. Os resultados foram submetidos ao programa *geNorm* que classifica os melhores genes constitutivos, baseado em algoritmos diferentes que utilizam como informação a análise CT (*Cycle threshold*) dos genes no tecido e nos diferentes grupos em três replicatas biológicas e a eficiência do iniciador em cada amostra biológica (ANDERSEN, 2004). Com esta análise

identificamos os genes que apresentam a menor variação quanto ao número de transcritos em cada tecido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As eficiências (E) obtidas dos iniciadores com os valores recomendados, indicando que ao final de cada ciclo da qPCR, a quantidade de transcritos é duplicada, com variação de aproximadamente 10%, não interferindo nos resultados obtidos.

Quando analisadas as respostas referentes a estabilidade dos genes de referência para a parte aérea de cultivares de arroz *Japonica* e *indica*, o programa geNorm indicou que dois genes obtiveram os valores mais estáveis, sendo eles, P2 (*Os01t0252200-01*) e P11 (*GAPDH*) (Figura 1). Sendo que P2 (0.806) obteve o menor valor de estabilidade, embora os demais genes também tenham apresentado valores menores que a média que é de 1.5M.

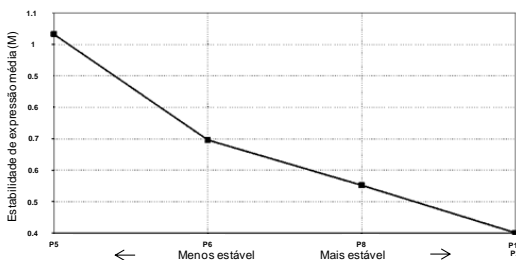


Figura 1. Resultados referentes as análises de estabilidade de expressão dos genes de referência na parte aérea de arroz. Classificação da estabilidade de expressão dos genes de referência para tecidos de parte aérea de arroz das subespécies *indica* e *japonica* pelo algoritmo geNorm. No eixo y: valor de estabilidade M e no eixo x: genes testados ordenados do menos estável para o mais estável. Dados gerados pelo algoritmo geNorm.

A importância deste estudo se eleva a partir de que resultados duvidosos podem ser encontrados quando genes alvo são normalizados contra genes de referência que não apresentam estabilidade e quando estes não são validados (DERVEAUX, 2010). Os genes P2 (*Os01t0252200-01*) e P11 (*GAPDH*) ganham maior destaque como genes com expressão mais estável devido ser recomendada a utilização de dois ou mais genes estáveis como controles internos para a normalização (ARTICO, 2010).

CONCLUSÃO

Os genes P11 (*GAPDH*), e P2 (*Os01t0252200-01*) são indicados como melhores genes de referência pelo programa geNorm para estudos de expressão de genes submetidos ao estresse por ferro em tecidos de parte aérea de plântulas de arroz pertencentes as subespécies *indica* e *japonica*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN CLJJ, ORNTOT TF: 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** 64:5245-5250, 2004.

ARTICO S, NARDELI SM, BRILHANTE O, GROSSI-DE-SA MF, FERREIRA MA: Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. **BMC Plant Biology**, p. 10-12, 2010.

BACHA, R: **Avaliação de linhagens e cultivares de arroz irrigado para condições adversas de solo: toxidez por ferro**. 19, 1993. In: Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, Balneário Camboriú. Anais. Florianópolis: EMPASC, p.156-159, 1993.

BENCKISER G, OTTOW JCG, SANTIAGO S, WATANABE I: Physiochemical characterization of iron-toxic soils in some Asian countries. IRRI research paper series 85. **The International Rice Research Institute**, Los Banos, The Philippines. 1982.

CONAB: **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 02 de novembro de 2014.

DERVEAUX S, VANDERSOMPELE J, HELLEMANS J: How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**; 50:227–230, 2010.

DOBERMANN A, FAIRHURST TH: RICE: Nutrient disorders and nutrient management. The International Rice **Research Institute, Manila, The Philippines**, p.191, 2000.

HELLEMANS J, MORTIER G, DE PAEPE A, SPELEMAN F, VANDESOMPELE J: qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**; v. 8, p.R19, 2007.

IRRI - **The International Rice Research Institute**. Disponível em <http://irri.org/>. Acesso em 02 de Junho de 2014.

MATTA BP, BITNER-MATHÉ BC, ALVES-FM: **Development Genes and Evolution** May;221(1):49-57. Epub 2011; Apr 21, 2011.

PFÄFFL MW, TICHOPAD A, PRGOMET C, NEUVIANS TP: Determinação de genes de limpeza estáveis, genes-alvo regulados diferencialmente e integridade da amostra: ferramenta de Excel baseado Bestkeeper usando pair-wise correlações. **Biotechnol Lett**26. 509-515, 2014.

PONTON F, CHAPUIS MP, PERNICE M, SWORD GA, SIMPSON SJJ: **Insect Physiology**, 57 (6) : 840 - 50, 2011.

RATERING S, SCHNELL S: Localization of iron-reducing activity in paddy soil by profile studies. **Biogeochemistry**, v. 48, p.341–365, 2000.

SANTOS RS, **Regulação Transcricional e Epigenética de ERFs em Arroz Sob Estresse Abiótico**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Pós Graduação em Biotecnologia; De 2012.

SCHMIDT F, FORTES MÁ, WESZ J, BUSS GL, SOUSA RO: Impacto de manejo da água na toxidez por ferro no arroz irrigado por alagamento, Química do solo, Comissão 2.4, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, p. 1226-1235, 2013.

VANGUIJLDER HD, VRANA KE, FREEMAN WM: Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, 44, 619–626, 2008.

YOSHIDA S, FORNO DA, COCK JH, GOMEZ KA: **Laboratory manual for physiological studies of rice**. Los Baños, IRRI, 1976.

ZHAO S, FERNALD RD: Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction **Journal of Computational Biology**, v.12, p. 1047-1064, 2005.