

IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS A REFERÊNCIA PARA NORMALIZAÇÃO EM RT-qPCR EM PLANTAS DE ARROZ E ARROZ-VERMELHO EM COMPETIÇÃO

Claudia de Oliveira¹; Daiane de Pinho Benemann²; Marcos André Nohatto³, Jessica Gomes da Silva⁴, Dirceu Agostinetto⁵

Palavras-chave: *Oryza sativa*, interferência, PCR em tempo real

INTRODUÇÃO

Genes de controle interno (genes de referência) são comumente utilizados para normalizar RT-qPCR e para reduzir possíveis erros gerados na quantificação da expressão do gene, a 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).

É provável que um ou mais genes sejam expressos de forma constitutiva através de um órgão específico, em um ambiente específico (ANDERSEN et al., 2004). Deste modo, a seleção e validação sistemática de genes de referência deve ser realizada antes de todas as análises de RT-qPCR (GUTIERREZ et al., 2008).

Geralmente são escolhidos como normalizadores genes que 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 de 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 um grupo de genes candidatos com base em sua estabilidade de expressão. Este algoritmo avalia a variação total de expressão dos genes candidatos através da soma de 94 variância (ANDERSEN et al., 2004).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão de dez 11 genes constitutivos e identificar normalizadores com expressão estável para estudos de expressão gênica por RT-qPCR em arroz e arroz-vermelho em competição sob diferentes doses de nitrogênio.

MATERIAL E MÉTODOS

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, em delineamento completamente casualizado, arranjado em esquema fatorial, sendo o fator A composto por diferentes combinações do cultivar de arroz IRGA 424 e de biótipo de arroz-vermelho, variando-se as proporções relativas de plantas por vaso (sem (100:0) e com (50:50) competição); e, o fator B constituído de doses de nitrogênio adicionadas ao solo (0, 120 e 240 kg N ha⁻¹). Aos 60 dias após a emergência, foi coletada a parte aérea das plantas, sendo armazenada a -80°C até o momento da extração de RNA total e análise molecular.

O RNA total foi extraído das folhas do arroz cultivado e do arroz-vermelho com a utilização do reagente PureLink™ (Plant RNA Reagent – Invitrogen™), obedecendo as

¹ Engº Agrº, Doutoranda em Fitossanidade, FAEM/UFPEL.oliveirac.agro@gmail.com..

² Bióloga. Pós-doutoranda em Fitossanidade FAEM/UFPEL

³ Engº Agrº, Dr.em Fitossanidade, FAEM/UFPEL.

⁴ Graduanda de agronomia. FAEM/UFPEL.

⁵ Engº Agrº, Dr. Professor do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, FAEM/UFPEL.

recomendações do fabricante. A obtenção dos cDNAs foi realizada com uso do Kit comercial SuperScript First-Strand System para RT-qPCR (Invitrogen™), 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 um espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific), com razões 260/280nm 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- α (Eef-1 α), Fator de iniciação de eucarioto 4- α (eLF-4a), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Ubiquitina-conjugada enzima E2 (UBC-E2), ubiquitina 5 (UBQ5), ubiquitina 10 (UBQ10), RNA ribossômico 18S (18S), β -Tubulina, cyclophilin e aquaporina (TIP41).

Para a reação de amplificação foi utilizado volume total de 12 μ L, contendo 6,25 μ L de LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science), 0,5 μ M de primer (10mM), 1 μ L de cDNA (0,2 μ 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). Todas as reações foram realizadas em triplicata para cada amostra de cDNA. 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 de 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 geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002). Posteriormente, foram obtidas informações adicionais referentes a média (X), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) de cada gene candidato a referência.

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 1,5 a 2,87 para arroz e 1,82 a 3,45 para arroz-vermelho. Para ambos os competidores, os genes endógenos 18S, cyclophilin, Eef-1 α , eLF-4a, GAPDH, UBC-E2, UBQ5 e UBQ10 tiveram sua eficiência dentro do esperado (entre 1,8 e 2,2), portanto foram utilizados para o teste de estabilidade, para o mais estável ser utilizado juntamente com o gene alvo.

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 foi o cyclophilin (0,70) seguido de UBC-E2 (M=0,81) (Figura. 1). Já, os maiores valores de M ficaram com GAPDH (M=2,11) seguido de 18S (M=1,85). O mesmo foi observado em arroz-vermelho, onde os genes UBC-E2 (M=0,41) e cyclophilin (M=0,49) foram os mais estáveis, enquanto que 18S (M=2,34) e UBQ10 (M=1,23) foram os menos estáveis (Figura 2).

Para avaliar a estabilidade de expressão dos genes de referência, além da análise com o programa NormFinder, também foi calculada e comparada análise de variância. Foi analisado os valores de coeficiente de variação (CV), desvio padrão (DP) e média (X) dos genes de referência de arroz e arroz-vermelho que apresentaram eficiência entre 1,80 e 2,20. Para a cultura, foi observado que UBC-E2, UBQ10 e eLF-4a apresentam os menores valores de CV (3,39; 4,14 e 3,45, respectivamente) e DP (0,94; 1,03 e 1,08, respectivamente), enquanto para a planta daninha UBC-E2, UBQ5 e eLF-4a, apresentaram menor CV (1,34; 1,57 e 2,18, respectivamente) e menor DP (0,38; 0,42 e 0,60, respectivamente), indicando maior

estabilidade de expressão destes genes (Tabela 1). O valor da média expressa no número de ciclos necessários para amplificação dos genes, para o arroz se observou variação de 18,08 (18S) a 32,92 (UBQ 10) e para o arroz-vermelho a variação foi de 18,61 (18S) a 30,30 (eLf-4a), todos os genes amplificaram antes do ciclo 35 o que é o indicado para a técnica.

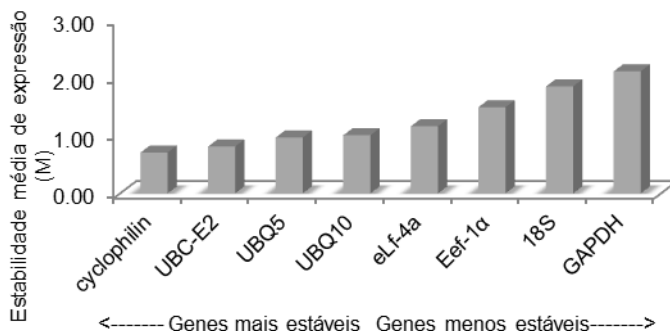


Figura 1. Estabilidade média de expressão (M) de acordo com o algoritmo NormFinder, de oito genes candidatos a referência para arroz em competição com arroz-vermelho, nas diferentes proporções e em diferentes doses de nitrogênio. FAEM/UFPEL, 2014.

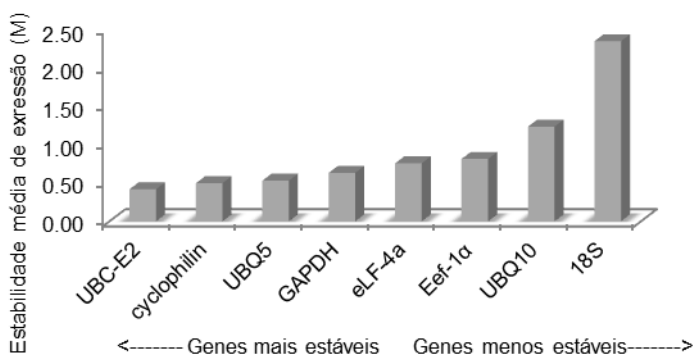


Figura 2. Estabilidade média de expressão (M) de acordo com o algoritmo NormFinder, de oito genes candidatos a referência para arroz-vermelho em competição com arroz, nas diferentes proporções e em diferentes doses de nitrogênio. FAEM/UFPEL, 2014.

A determinação de um gene normalizador adequado para estudo de expressão gênica é o primeiro passo para análise do padrão de expressão relativa de genes alvo de interesse, conferindo caráter confiável aos resultados obtidos. De acordo com os critérios de aceitação

geral, o gene de referência ideal é expresso de forma estável (ou com pequena variação na expressão) entre os conjuntos de amostras investigadas e tem nível de expressão comparável à do gene alvo (ANDERSEN et al., 2004). Genes de referência apropriados já foram identificados para muitas culturas, especialmente para as plantas modelo (CZECHOWSKI et al., 2005), porém, poucos genes de referência foram validados para as plantas daninhas.

Tabela 2. 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. FAEM/UFPeL, 2014.

		18S	cyclophilin	Eef-1a	Elf-4a	GAPDH	UBC-E2	UBQ5	UBQ10
CV	A	10,40	4,49	11,69	3,45	8,99	3,29	5,44	4,14
	AV	9,41	2,63	2,51	2,18	2,96	1,34	1,57	3,11
DP	A	1,88	1,34	3,74	1,08	2,46	0,94	1,35	1,03
	AV	1,75	0,78	0,75	0,60	0,77	0,38	0,42	0,76
X	A	18,08	29,92	32,01	31,30	27,41	28,79	27,00	32,92
	AV	18,61	30,00	29,94	30,30	26,24	28,63	26,90	24,52

Com base nos resultados de eficiência, análise de variância e estabilidade média de acordo com o NormFinder, foi selecionado para o arroz e arroz-vermelho o gene normalizador UBC-E2. Estes resultados serão de grande importância para estudos de normalização em RT-qPCR nas condições testadas. A enzima de conjugação de ubiquitina (UBC, E2) e um dos três principais componentes do sistema de ubiquitinação, esta enzima liga a ubiquitina (Ub) a um substrato. A ubiquitinação está envolvida em muitos processos importantes, como o crescimento das plantas, o desenvolvimento, a regulação hormonal, a floração e resposta ao estresse biótico e abiótico (DREHER & CALLIS 2007).

CONCLUSÃO

O gene de referência mais estável, para a cultura do arroz e para arroz-vermelho em competição, sob diferentes doses de nitrogênio é o UBC-E2.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do DECIT/SCTIE-MS, por intermédio do CNPq e da FAPERGS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, 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. et. al. Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.139, p.5–17, 2005.
- DREHER, K.; CALLIS, J. Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. **Annals of Botany**, v.99, p.787–822, 2007.
- GUTIERREZ, L. et.al. Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. **Plant Cell**. v.20, p.1734–1735, 2008.
- PAOLACCI, A.R. et. al. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. **BMC Molecular Biology**, v.10, p.11, 2009.
- RASMUSSEN, R.P. Quantification on the Light Cycler. In: MEUER, S.; WITTEWER, C.T.; NAKAGAWARA, K. Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications. 1ªed. Springer Press, Heidelberg, 2001 pp 21-34.
- SILVER, N. et. al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC BMC Molecular Biology**, v.7, p.33-42, 2006.
- VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v.3, p.1-11, 2002.