

SELEÇÃO DE GENES NORMALIZADORES PARA ESTUDOS DE RT-qPCR EM DIFERENTES TECIDOS DE PLANTAS DE ARROZ SUBMETIDAS A SALINIDADE EM ESTRESSE RECORRENTE

TATIANA ROSSATTO¹; MARCELO NOGUEIRA DO AMARAL¹; PRISCILA ARIANE AULER¹; LILIANE SILVEIRA VARNES¹; CHRISLAINE YONARA SCHOENHALS RITTER¹; EUGENIA JACIRA BOACEL BRAGA¹

¹Departamento de Botânica, Instituto de Biologia - Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil, e-mail: tatyrossato@hotmail.com; theoamaral@hotmail.com; pri_auler@hotmail.com; liliane.varnes@outlook.com; chrislaineritter@hotmail.com; jacirabraga@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Altas concentrações de Na⁺ e Cl⁻ na solução do solo, podem resultar em hiperosmose e condições hiperiônicas que impede a absorção de água e nutrientes pelas plantas (YANG; GUO, 2018). O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado sensível à salinidade principalmente nos estádios vegetativo e reprodutivo. Diante desta preocupação se faz necessário entender se a pré-exposição de plantas de arroz a uma condição desfavorável durante o estágio vegetativo pode mitigar ou não os efeitos de uma segunda exposição a esta condição desfavorável. O que é conhecido e nomeado por BRUCE et al. (2007) como *Imprint* ou memória de estresse, que pode ser definida como modificações estruturais, genéticas e bioquímicas que ocorrem como consequência da exposição anterior ao estresse e que tornam as plantas, geralmente, mais resistentes para as futuras.

A compreensão e a eficácia das respostas das plantas à salinidade nos últimos anos têm-se baseado principalmente em análises genéticas e bioquímicas. Os padrões de expressão gênica refletem a tendência da atividade gênica e fornecem uma visão da função do gene e das redes de regulação gênica em plantas sob estresse salino (RUDUŠ; KEPCZYŃSKI, 2018). Um dos métodos mais utilizados para avaliar a expressão gênica é a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) pois é considerada uma técnica confiável, sensível e precisa. Desta forma, para a maior confiabilidade dos dados de RT-qPCR, é essencial que a expressão dos genes alvos seja comparada com a expressão de um gene estável (CAI et al., 2018).

Os genes constitutivos são necessários para a manutenção de funções celulares básicas, como a divisão celular, crescimento e desenvolvimento da planta. Entre os mais estudados em análises de RT-qPCR com plantas, estão a *actina* (*ACT*) (MAROUFI et al., 2010), *tubulina* (*TUB*) (WAN et al., 2010), *ubiquitina* (*UBQ*) (CHEN et al., 2011) entre outros. A escolha de genes de referência confiáveis como controles internos para normalizar a expressão gênica em qRT-PCR é extremamente importante para evitar falhas e para determinar a expressão precisa de genes alvos (HAN et al., 2017). O presente estudo teve por objetivo avaliar a estabilidade da expressão de dez genes sob diferentes tratamentos e em diferentes tecidos de plantas de arroz, a fim de identificar genes de referência adequados para a análise de RT-qPCR nessas condições e para esta cultivar.

2. METODOLOGIA

Plântulas de arroz, cv. BRS AG, após 10 dias de germinação, foram transferidas para casa de vegetação e transplantadas para vasos com capacidade de oito litros, sendo utilizado como substrato areia previamente lavado com água e ácido clorídrico 1 %. A irrigação ocorreu diariamente, alternada com água e solução nutritiva. As plantas permaneceram nessas condições até atingirem o estágio V5, onde foram submetidas ao estresse salino, ou seja, receberam solução nutritiva acrescida de 150mM de NaCl nos vasos pertencentes aos tratamentos T3 e T4. Após esse período as plantas permaneceram com irrigação normal, alternando água e solução nutritiva, até chegarem ao período reprodutivo R8. Durante o período reprodutivo as plantas pertencentes aos tratamentos T2 e T3 receberam a solução com 150mM de NaCl, durante sete dias, enquanto que os demais receberam apenas solução nutritiva. Desta maneira, foram nomeados quatro tratamentos: T1: Controle; T2: Aplicação de 150mM de NaCl + solução somente no estágio R8; T3: Aplicação de 150mM de NaCl + solução em ambos os estádios V5 e R8; T4: Aplicação de 150mM de NaCl + solução somente no estágio V5. Ao final dos sete dias de estresse na fase reprodutiva R8 (enchimento de grãos), foram coletadas amostras de folha, bainha, ráquis e grãos de cada tratamento.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com uma cultivar (BRS AG) e quatro tratamentos (T1, T2, T3 e T4). As coletas foram realizadas em triplicatas biológicas. A unidade experimental foi constituída de um vaso contendo quatro plantas, sendo cada vaso uma repetição biológica.

O RNA total de todos os tecidos (folha, bainha, ráquis e grão) foi isolado usando o tampão de extração TRIzol Reagent (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade e pureza de RNA foram mensuradas em NanoDrop (ND-1000), e a integridade e qualidade do RNA foram verificadas em eletroforese com gel de agarose 1,5 %. A síntese de cDNA fita simples foi feita a partir do RNA (1µg/µL), utilizando-se do *kit SuperScript FirstStrand System for RT-PCR* (Invitrogen).

As reações de RT-qPCR foram realizadas em equipamento Termociclador Bio-Rad CFX Real Time, utilizando o sistema de fluoróforo SYBR Green (Roche®). O volume total das reações foi de 12 µL, sendo 6,25 µL do fluoróforo, 0,25 µL (10 mM) de cada *primer* (senso e antisenso), 1 µL de cDNA (diluição 1:5, previamente definida) e 4,25 µL de água ultra pura.

Para validação da expressão gênica, um total de dez genes foram selecionados com base em trabalhos já publicados, utilizados como controle interno nas análises de RT-qPCR. Os genes selecionados foram: *actina 11* (*ACT11*), *ubiquitina conjugada com enzima E2* (*UBC-E2*), *Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* (*GAPDH*), *Beta Tubulina* (β -*Tubulina*), *Fator de iniciação eucariótica 4 α* (*eIF-4- α*), *Ubiquitina 10* (*UBQ10*), *Ubiquitina 5* (*UBQ5*), *Aquaporina* (*TIP41*), *Ciclofilina* e *EeF-1 α* . O nível de expressão dos genes em cada reação foi determinado usando o limiar do ciclo Cq nos diferentes tecidos da cultivar BRS AG. Para isso foi utilizado o software RefFinder, que faz uso dos quatro algoritmos principais atualmente disponíveis para a seleção de genes de referência: geNorm, NormFinder, BestKeeper e o método comparativo ΔC_t .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em folhas da cv. BRS AG, no estágio reprodutivo, RefFinder indicou como genes mais estáveis, *UBC-E2* e *GAPDH* (Figura 1a). Observou-se que para o tecido bainha (Figura 1b), os genes *UBQ5* e *UBQ10* foram indicados

como os dois mais estáveis. Por outro lado, os genes que apresentaram maior estabilidade de expressão para o tecido ráquis, da cv. BRS AG, foram *TIP41-like* e *UBQ10*, pelo método RefFinder (Figura 1c). Em relação à estabilidade de expressão dos genes para os grãos da cv. BRS AG, identificou-se os genes *TIP41-like* e *Ciclofilina* como os melhores para esse tecido (Figura 1d). Enquanto que o RefFinder indicou os genes *ACT11*, β -tubulina e *Eef-1 α* como os menos estáveis para a folha, bainha, ráquis e grão, respectivamente.

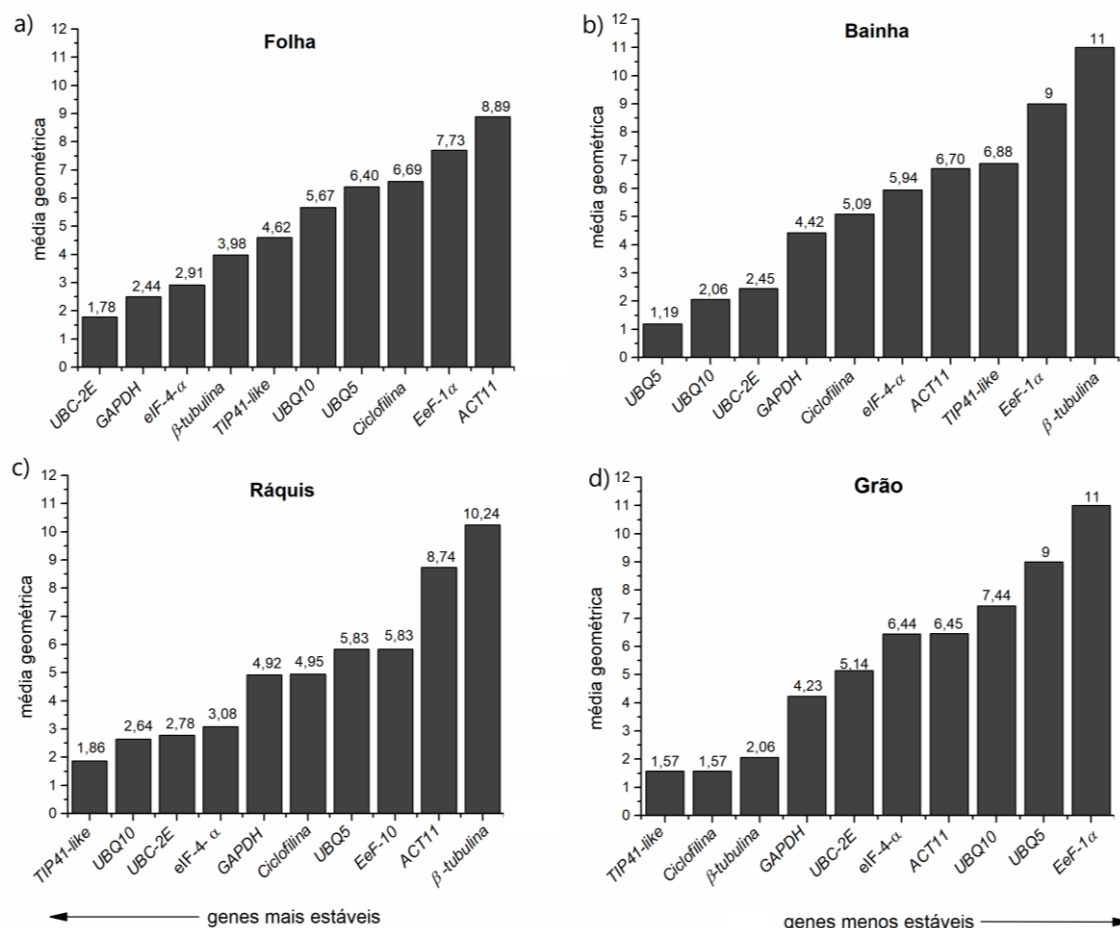


Figura 1 - Estabilidade de expressão de dez genes candidatos à referência em folha (a), bainha (b), ráquis (c) e grão (d) de arroz cv. BRS AG, em diferentes momentos sob estresse salino (150mM de NaCl) ao longo do ciclo segundo o RefFinder.

De acordo com estudos anteriores, sobre a seleção de genes de referência em plantas para RT-qPCR, o nível de expressão de um gene de referência pode não ser constante entre várias espécies. Além disso, a variação pode ocorrer dentro da mesma espécie em resposta a vários tratamentos ou diferentes tecidos vegetais. De modo que, os próprios genes envolvidos em processos do metabolismo podem exibir variações significativas na expressão em determinadas situações (REID et al., 2006). Nesse estudo foi possível observar que a expressão dos genes de referência altera em diferentes tecidos na mesma espécie. Portanto, a escolha de genes de referência apropriados é uma etapa crucial, tanto para evitar a má interpretação quanto para certificar-se de que os resultados são confiáveis (CAI et al., 2018).

4. CONCLUSÕES

Os resultados mostraram os genes (*UBC2E* + *GAPDH*) para as folhas, (*UBQ5* + *UBQ10*) bainha, (*TIP41* + *UBQ10*) ráquis e (*TIP41* + *Ciclofilina*) para os grãos como os mais apropriados nesta espécie estudada. Em contrapartida, nesses tecidos os genes que apresentaram maior variação foram *ACT11*, β -*tubulina*, *EeF-1 α* .

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUCE, T.J.A.; MATTHES, M.C.; NAPIER, J.A.; PICKETT, J.A. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, California, v. 173, n. 6, p. 603–608, 2007.

CAI, J.; LI, P.; LUO, X.; CHANG, T.; LI, J.; ZHAO, Y.; XU, Y. Selection of appropriate reference genes for the detection of rhythmic gene expression via quantitative real-time PCR in Tibetan hulless barley, **PLoS One**, California, v. 13, n. 1, p.0190- 559, 2018.

CHEN, I.C.; HILL, J.K.; OHLEMÜLLER, R.; ROY, D.B.; THOMAS, C.D. Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming. **Science**, California, v.333, n. 6045, p.1024–1026, 2011.

HAN, P.P.; QIN, L.; LI, Y.S.; LIAO, X.S.; XU, Z.X.; HU, X.J.; XIE, L.H.; YU, C.B.; WU, Y.F.; LIAO, X. Identification of suitable reference genes in leaves and roots of rapeseed (*Brassica napus* L.) under different nutrient deficiencies, **Journal of Integrative Agriculture**, Beijing, v. 16, n. 4, p. 809–819, 2017.

MAROUFI, A.; VAN BOCKSTAELE, E.; DE LOOSE, M. Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, London, v.11, n. 15, p.1-12, 2010.

REID, K.E.; OLSSON, N.; SCHLOSSER, J.; PENG, F.; LUND, S.T. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. **BMC plant biology**, Cambridge, v. 6, n.1, p. 27, 2006.

RUDUŚ, I.; KĘPCZYŃSKI, J. Reference gene selection for molecular studies of dormancy in wild oat (*Avena fatua* L.) caryopses by RT-qPCR method. **PLoS ONE**, California, v.13, n. 2, p. 0192343, 2018.

WAN, H.; ZHAO, Z.; QIAN, C.; SHUI, Y.; MALIK, A.A.; CHEN, J. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 399, n. 2, p. 257–261, 2010.

YANG, Y.; GUO, Y. Unraveling salt stress signaling in plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v.60, n. 9, p. 796-804, 2018.