

ESTABILIDADE DE GENES NORMALIZADORES PARA PCR EM TEMPO REAL PARA SOJA E CAPIM PÉ-DE-GALINHA EM COMPETIÇÃO

OLIVEIRA,C. (FAEM – UFPEL, Capão do Leão/RS – oliveirac.agro@gmail.com), FRANCO, J.J. (FAEM – UFPEL, Capão do Leão/RS - jaderjobfranco@yahoo.com.br), BENEMANN, D.P. (FAEM – UFPEL, Capão do Leão/RS - daiane_bio@yahoo.com.br), MANICA-BERTO, R. (FAEM – UFPEL, Capão do Leão/RS – robertamanica@yahoo.com.br), AGOSTINETTO, D. (FAEM-UFPEL, Capão do Leão/RS - dirceu.agostinnetto@pq.cnpq.br)

RESUMO: A técnica quantitativa de PCR em tempo real, RT-qPCR, permite analisar a expressão de genes alvo em diferentes condições experimentais. No entanto, a análise concisa dos resultados gerados pela RT-qPCR está diretamente relacionada ao gene normalizador utilizado, o qual deve apresentar expressão constitutiva semelhante para as diferentes amostras/tratamentos avaliados no experimento. O presente trabalho teve como objetivo selecionar genes normalizadores com expressão gênica constitutiva e estável para plantas de soja e biótipos de capim-pé-de-galinha suscetível ou com resistência de nível baixo ao glyphosate, quando em competição. Para tal, genes potencialmente candidatos a normalizadores foram selecionados e tiveram o padrão de expressão aferido por PCR em tempo real na cultura e na planta daninha. Os dados gerados foram analisados estatisticamente por meio da análise de variância e também foi calculada e comparada a estabilidade média de expressão (M) utilizando o algoritmo do programa geNorm. Os resultados sugerem os genes *60S* e *tubulina* como normalizadores mais adequados para análises de expressão gênica por PCR em tempo real em soja e capim-pé-de-galinha, respectivamente, quando em competição.

Palavras-chave: RT-qPCR, *Glycine max*, *Eleusine indica*.

INTRODUÇÃO

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram sofisticados mecanismos que as permitem perceber as variações nas condições ambientais, ativando cascatas de tradução de sinais, que, por consequência, ativam genes de resposta ao estresse levando a mudanças fisiológicas e bioquímicas (COTSAFTIS et al., 2011). Em soja e capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica*), não há estudos voltados para a identificação de genes expressos em resposta ao estresse gerado pela competição. Portanto, é necessário que, dentro de tais experimentos, alguns genes sejam selecionados como candidatos, os quais devem ser validados em análises mais pontuais para quantificar sua expressão em resposta ao

estresse competitivo.

Uma das técnicas de biologia molecular amplamente utilizada para a validação dos dados de expressão gênica é a técnica de RT-qPCR (*quantitative RT-PCR*), pois apresenta sensibilidade e reprodutibilidade na análise de transcritos. No entanto, esta técnica necessita de padronização para a correta interpretação dos dados obtidos. Tal padronização é feita pela análise dos genes de alvo simultaneamente com um ou mais genes constitutivos que possuam expressão uniforme na maioria das células do organismo de estudo, bem como, durante os estádios de desenvolvimento e sob diferentes condições do ambiente. Estes genes constitutivos são chamados de normalizadores na técnica de RT-qPCR.

Os genes normalizadores ou de referência atuam como controles internos em reações de PCR em tempo real, tendo a finalidade de remover ou reduzir as diferenças da amostragem que muitas vezes estão relacionadas à quantidade e qualidade do RNA extraído (OLSVIK et al., 2005). A expressão desses genes é considerada pouco flutuante em comparação com outros genes, no entanto, em determinadas condições, sua expressão pode variar consideravelmente, sendo que, para a análise de RT-qPCR os normalizadores devem ser expressos aproximadamente no mesmo nível que o RNAm dos genes em estudo (OLSVIK et al., 2005).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão de genes potencialmente constitutivos e identificar normalizadores com expressão estável para estudos de expressão gênica por RT-qPCR na cultura da soja em associação com biótipos de capim-pé-de-galinha suscetível e resistente ao glyphosate.

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 experimental completamente casualizado, com três repetições. Utilizou-se sementes da cultivar de soja FUNDACEP 59 e capim pé-de-galinha com resistência de nível baixo (RNB) ao herbicida glyphosate, provenientes de Boa Vista do Incra/RS (VARGAS, 2013) e, as do biótipo suscetível (SUS) ao glyphosate, foram obtidas no município de Camaquã/RS. O experimento foi instalado em série de substituição variando-se as proporções relativas de plantas por vaso de 100:0, 50:50 e 0:100 (20:0, 10:10 e 0:20), com manutenção da população total de 20 plantas por vaso.

O RNA total foi extraído de acordo com o método descrito para o reagente *Plant RNA Reagent Purilink*[®]. Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa a

partir de RNA total utilizando primer oligoDT e Kit *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen®).

Foram selecionados como possíveis normalizadores 10 genes para soja e sete para capim-pé-de-galinha, citados na literatura como controle interno nas análises de RT-qPCR e que, supostamente, não apresentam variação significativa entre os tratamentos analisados. Os genes selecionados para soja foram: *UBQ10*, *60S*, *FBOX*, *ACT11*, *TUA5*, *ACT2/7*, *TUB4*, *ELF1B*, *SKIP16*, *MTP*; e, para capim-pé de galinha foram: *UBC-E2*, β -*TUB*, *UBQ5*, *Eef1-a*, *Elf4-a*, *ACT11* e *18S*.

O volume total das reações de qRT-PCR foi de 12 μ l, sendo 6,25 μ l do fluoróforo SYBR Green (Applied Biosystems®), 0,25 μ l (10 mM) de cada primer (forward e reverse), 1 μ l de cDNA e 4,25 μ l de água ultra pura. As reações foram realizadas em Termociclador LightCycler 480 e para cada repetição biológica foram feitas três repetições técnicas (triplicatas). Foi realizado pool dos cDNAs dos biótipos capim-pé de galinha suscetível e resistente ao glyphosate.

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 ao nível de significância (P), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%) de cada gene candidato a normalizador. Foi utilizado o programa estatístico Winstat (Machado & Conceição, 2002) para as análises.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar a estabilidade de expressão dos genes candidatos a normalizadores, foi calculada e comparada a estabilidade média de expressão (M) utilizando o algoritmo do programa geNorm. Este algoritmo utiliza o princípio de que a razão da expressão de dois genes de referência deve ser constante através de diferentes condições experimentais e/ou órgãos/tecido. O valor de M é definido como a variação média de um certo gene em relação a todos os outros testados. Com base nos valores de M calculados para os 10 genes, observou-se que *60S* e *FBOX* (M=0,23) são os genes mais estáveis e *ACT11* (M=0,62) o menos estável, em soja (Figura 1A). Ao estudar a estabilidade de vários genes candidatos a normalizadores em diferentes estresses em plantas de azevém, foi verificado que o gene *60S* foi o menos estável para estresse por sal, alta temperatura e ácido abscísico (ABA) (HUANG et al. 2014).

Para capim-pé-de-galinha, observou-se que *UBC* e *TUB* (M=0,66) são os genes mais estáveis e *18S* (M=1,62) o menos estável (Figura 1B). Em plantas do gênero *Populus*, foi verificado que genes de tubulina foram os mais estáveis (BRUNNER et al. 2004). Por outro lado, Expósito-Rodríguez et al. (2008), identificaram os genes de tubulina como os mais

instáveis em estudos com diferentes órgãos e estádios de desenvolvimento em *Solanum lycopersicum*.

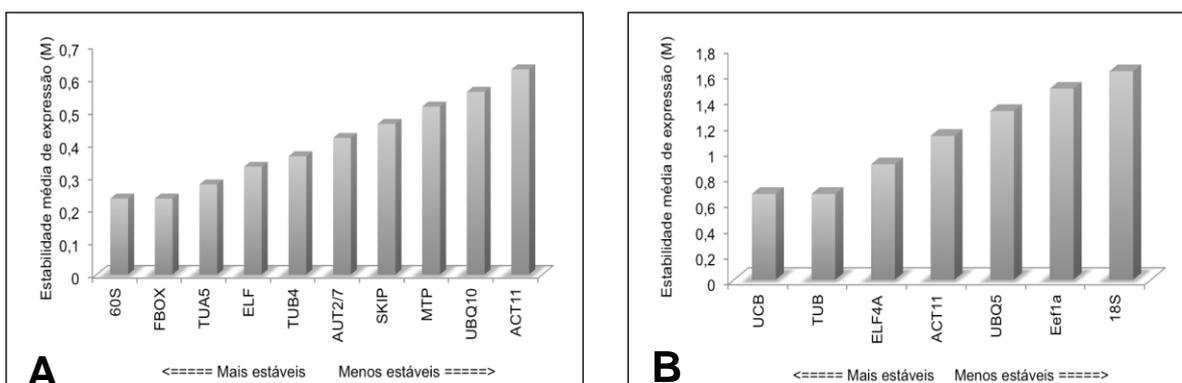


Figura 1. Estabilidade média de expressão (M) de acordo com o algoritmo geNorm de 10 genes candidatos a normalizadores para a cultura da soja (A) e sete genes candidatos a normalizadores para o capim-pé-de-galinha (B). CEHERB/FAEM/UFPel, 2014.

Os valores de nível de significância (P), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%), em plantas de soja e capim-pé-de-galinha, demonstram que, dentre os genes testados, o *60S* e a *tubulina* foram os que obtiveram menores níveis de significância (0,03; 0,02, respectivamente), bem como menor CV% (2,06; 2,63, respectivamente), indicando maior estabilidade de expressão destes genes (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Nível de significância (P), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%) de 10 genes candidatos a normalizadores para soja. CEHERB/FAEM/UFPel, 2014.

	<i>UBQ10</i>	<i>60S</i>	<i>FBOX</i>	<i>ACT11</i>	<i>TUA5</i>	<i>ACT2/7</i>	<i>TUB4</i>	<i>ELF1B</i>	<i>SKIP16</i>	<i>MTP</i>
P	0,22	0,03	0,28	0,04	0,25	0,14	0,22	0,23	0,03	0,08
DP	0,07	0,95	0,82	1,09	0,69	0,86	0,9	0,96	0,76	1,01
CV%	3,15	2,06	2,69	3,5	2,29	2,79	2,84	2,86	2,25	2,91

Tabela 2. Nível de significância (P), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%), de 7 genes candidatos a normalizadores para capim-pé-de-galinha. CEHERB/FAEM/UFPel, 2014.

	<i>UBC-E2</i>	β - <i>TUB</i>	<i>UBQ5</i>	<i>Eef1-a</i>	<i>ACT11</i>	<i>18S</i>	<i>ELF4-a</i>
P	0,13	0,02	0,09	0,45	0,38	0,40	0,14
DP	1,39	0,92	3,03	0,79	2,26	1,00	1,48
CV%	4,10	2,63	5,75	2,99	6,02	5,04	4,04

A avaliação conjunta dos resultados sugere que os genes constitutivos podem ser regulados de forma diferenciada em diferentes espécies de plantas. Assim, um gene normalizador, com expressão estável em um organismo, pode não ser adequado para a normalização da expressão de genes em outro organismo, sob determinado conjunto de condições, sendo necessária sua validação antes de ser utilizado (JAIN et al, 2006).

CONCLUSÕES

Os genes constitutivos *60S* para a cultura da soja e *tubulina* para o biótipo de capim-pé-de-galinha, são os mais estáveis e adequados para estudos em RT-qPCR de estresse por competição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUNNER, A.M. et al. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. **BMC Plant Biology**, v.4, n.14, p.1-7, 2004.

COTSAFTIS,O. Root-specific transcript profiling of contrasting rice genotypes in response to salinity stress. **Molecular Plant**, v.4, n.1, p.25-41, 2011.

EXPÓSITO-ROGRÍGUEZ, et al. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, v.8, n.131, p.1-9, 2008.

HUANG, L. et al. Identification of candidate reference genes in perennial ryegrass for quantitative RT-PCR under various abiotic stress conditions. **PLOS ONE**, v.9, n.4, p.1-10, 2014.

JAIN, M. et al. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.345, n.2, p.646-651, 2006.

MACHADO, A.; CONCEIÇÃO, A.R. **Programa estatístico WinStat**: sistema de análise estatístico para Windows, versão 2.0. Pelotas-RS, 2002.

OLSVIK, P.A., et al. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. **BMC Molecular Biology**, v.6, n.21, p.1-9, 2005.

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, n.7 p.1-11, 2002.

VARGAS, L. et al. Low level resistance of goosegrass (*Eleusine indica*) to glyphosate in Rio Grande do Sul-Brazil. **Planta Daninha**, v.31, n.3, p.677-686, 2013.