UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal

Dissertação

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES NORMALIZADORES E DA FAMÍLIA *LTPs1*, EM GENÓTIPOS DE ARROZ SOB ESTRESSE SALINO

Gabriela Peres Moraes

Pelotas, 2013

Gabriela Peres Moraes

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES NORMALIZADORES E DA FAMÍLIA *LTPs1*, EM GENÓTIPOS DE ARROZ SOB ESTRESSE SALINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Dra. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Co-orientador: Dra. Letícia Carvalho Benítez

Dr. Valmor João Bianchi

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz - CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M827e Moraes, Gabriela Peres
Expressão diferencial de genes normalizadores e da família LTPs1, em genótipos de arroz sob estresse salino / Gabriela Peres Moraes. – 83f. ; il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2013. – Orientador Eugenia Jacira Bolacel Braga ; co-orientador Letícia Carvalho Benítez e Valmor João Bianchi.

1.Arroz irrigado. 2.*Oryza sativa* L. 3.Estresse abiótico. 4.UBQ10. 5.Proteínas de transferência lipídica. I.Braga, Eugenia Jacira Bolacel. II.Benítez, Letícia **Carvalho. III.Bianchi, Valmor João. IV.Título.**

CDD: 633.18

Banca examinadora:

Profª. Dra. Eugenia Jacira Bolacel Braga (Presidente da Banca)
Prof. PhD. Antônio Costa de Oliveira
Dra. Caroline Marques Castro
Dra. Daiane de Pinho Benemann (Suplente)

Aos meus pais, Francisco e Lucia Helena,
à minha avó Lilian,
pela educação e pelos cuidados
Ao meu esposo Luís,
pelo amor, carinho e amizade.

Dedico

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais e avó que mesmo longe fisicamente nos últimos sete anos sempre estiveram presentes me dando coragem, amor, carinho, e atenção.

- Ao meu esposo pelo amor, carinho, amizade, eterna paciência, dedicação e principalmente pelo apoio nos mais diversos momentos desta caminhada.

- A Professora Eugenia pela orientação, amizade e por acreditar que este trabalho iria dar certo.

- A Letícia pela orientação, apoio, amizade, dedicação, carinho e principalmente pela paciência...

- Ao Professor Luciano Maia pela dedicação, orientação e paciência.

- Ao Professor Valmor João Bianchi pela amizade e conhecimento científico.

- Ao pesquisador da EMBRAPA Clima Temperado Ariano Martins de Magalhães Jr, que gentilmente cedeu às sementes de arroz.

- Ao Professor Sidnei Deuner pela orientação nas análises de proteínas...

- Ao Professor José Antonio Peters pela amizade e conhecimento científico que me foi transmitido.

- A minha amiga e colega de curso Isabel Lopes Vighi, pelo companheirismo, amizade, apoio e carinho.

- Aos parceiros de grupo Marcelo Nogueira do Amaral e Priscila Ariane Auler.

- As amigas e colegas de laboratório Fátima Rosane Schuquel Klein, Daiane de Pinho Benemann, Daiane Tereza Silva, Cristina Weiser Ritterbusch, Letícia Neutzling Rickes, Elsa Kuhn Klumb, Natália Dias Gomes da Silva, e Mirian Ribeiro.

- A todos os estagiários do LCTP.

- A secretária do PPGFV Sandra Sacco Silva pela dedicação, empenho e por sempre estar disposta a ajudar todos que precisam.

- A agência CAPES, que sem ela esse sonho não poderia ser realizado.

- A todas essas pessoas maravilhosas um forte abraço!

RESUMO

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES NORMALIZADORES E DA FAMÍLIA *LTPs1*, EM GENÓTIPOS DE ARROZ SOB ESTRESSE SALINO

Na orizicultura, a salinização do solo e da água de irrigação, durante as fases de estabelecimento e reprodutiva está intimamente relacionada com a variação nos níveis de produção. Dentre os principais danos causados pelo estresse salino em nível celular, estão os distúrbios na membrana plasmática, sendo seus efeitos manifestados por alterações na permeabilidade, na composição lipídica, potencial elétrico e atividade de enzimas e proteínas ligadas a ela. As proteínas LTPs ("Lipid Transfer Proteins") estão relacionadas com a transferência e ligação de ácidos graxos e fosfolipídios entre as membranas, além de estarem envolvidas na modificação da composição lipídica e biogênese destas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão de dez genes candidatos a normalizadores para estudos de expressão gênica e verificar a expressão diferencial de 11 genes *LTPs* em plântulas de arroz. Os genótipos BRS Bojuru (tolerante) e BRS Ligeirinho (sensível) foram expostos a 150 mM de NaCl nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas. O gene normalizador *UBQ10* foi o mais estável para estas condições experimentais testadas, enquanto que os menos estáveis foram *IF-4α*, *TIP41-LIKE* e *Cyclophilin*, sendo, portanto, os menos indicados. Dentre os genes *LTPs* avaliados, *LTP10* apresentou alto valor de expressão (70 vezes mais) nas 96 horas de estresse, quando comparado ao controle no genótipo sensível. Para BRS Bojuru esse mesmo gene manteve o padrão de expressão durante os tempos de exposição ao estresse.

O gene *LTP14* apresentou padrão de expressão semelhante entre os genótipos estudados. No início do estresse, o nível de expressão manteve-se praticamente inalterado, seguido de aumento e sucessiva diminuição a partir das 72 h de exposição ao sal. A partir da análise de correlação observou-se que *LTP7* e *14* apresentaram correlação positiva, enquanto que *LTPs 10*, *26* e *23* apresentaram correlação negativa entre os genótipos. As árvores filogenéticas mostraram uma tendência de agrupamento semelhante entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos analisadas. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o gene *UBQ10* é o melhor normalizador para as condições experimentais testadas e os genes *LTP10*, *23* e *26* poderão ser utilizados como possíveis marcadores para a seleção assistida de plantas de arroz para o estresse salino por apresentarem resposta de expressão contrastante entre os genótipos.

Palavras chave: Estresse abiótico, *Oryza sativa* L., *UBQ10*, proteínas de transferência lipídica

ABSTRACT

Differential expression of normalizing genes and the family *LTPs1*, in genotypes of rice under saline stress

On the production of rice, the salinization of the soil and the water of irrigation, during the establishment phases its closely related to the variation in the levels of production. Among the main damages caused by saline stress at cellular level, are the disturbances in the plasmatic membrane, being its effects manifested by alterations on the permeability, lipid composition, electrical potential and activity of proteins linked to it. The proteins LTPs ("Lipid Transfer Proteins") are related to the transfer and connection of fatty acids and phospholipids between membranes, in addition to being involved in the modification of the lipid composition and their biogenesis. On this note, the objective of this work was to analyze the expression of ten candidate genes to normalizing for studies of genetic expression and verify the differential expression of eleven genes *LTPs* in rice seedlings. The genotypes BRS Bojuru (tolerant) and BRS Ligeirinho (sensitive) were exposed to 150mM of NaCl in times 0, 24, 48, 72 and 96 hours. The normalizing gene *UBQ10* was the most stable for these experimental conditions tested, while the least stable were *IF-4a*, *Tip41-Like* and *Cyclophilin*, being, therefore not in, the least indicated. Among the analyzed *LTPs* genes, *LTP10* presented a high expression value (70 times more) in the 96 hour of stress, when compared to the control in sensitive genotype. For the BRS Bojuru this same gene kept the expression standards while exposed in different times to the stress. The gene *LTP14* showed similar patterns of expression between the genotypes studied. In the beginning of the stress, the level of expression practically unaltered, followed by increase and successive decrease after 72 hrs of salt exposure. After the correlation analysis, it was observed that *LTP7* and *14* showed a positive correlation, while *LTPs 10*,*26* and *23* showed negative correlation among genotypes. The phylogenetic tree showed a grouping tendency similar to the nucleotides and amino acids sequences analyzed. Based on the results of this study, it was concluded that the gene *UBQ10* is the best normalizing for the experimental conditions tested and the genes *LTP10*, *23* and *26* can be used as a marker for the

assisted selection of rice plants for the saline stress for showing contrasting response of expression between genotypes.

Key-words: Abiotic stress, *Oryza sativa* L., *UBQ10*, lipid transfer protein.

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO GERAL 10

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 16

ARTIGO I - Seleção de normalizadores para estudos de expressão gênica por qRT-PCR em plântulas de arroz sob estresse salino

Genetics and Molecular Biology (ISSN 1415-4757 / ISSN 1678-4685)

Resumo 21

Introdução 22

Material e Métodos 25

Resultados 31

Discussão 40

Conclusões 44

Bibliografia 45

ARTIGO II - Expressão de genes *LTPs1* em resposta ao estresse salino em plântulas de arroz

Plant Molecular Biology (ISSN: 0167-4412/ ISSN: 1573-5028)

Resumo 50

Introdução 52

Material e Métodos 54

Resultados 59

Discussão 75

Conclusões 78

Bibliografia 78

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil ocupa uma posição de destaque na produção mundial de arroz, sendo ele responsável por mais de 2% da produção mundial, destacando-se por ser o único país não asiático entre os maiores produtores. Segundo dados do CONAB 2013, a produção nacional, em função de uma expectativa de melhoria generalizada nos níveis de produtividade deverá apresentar um incremento de 4,0%, atingindo 12.062 milhões de toneladas na temporada 2012/13, contra 11.599 milhões de toneladas no exercício anterior.

Essa expectativa é respaldada pelo fato de que juntos, os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, irão contribuir com 75% da oferta nacional, sendo deste total 65,2% advindo das lavouras do Rio Grande do Sul. Esta garantia se estabelece em função da performance da produtividade que estes normalmente alcançam, com produto de excelente qualidade, cultivado em sistema totalmente irrigado (CONAB, 2013). Diante destes dados, pesquisas científicas, com este cereal, são justificadas tanto pelo impacto econômico quanto social da orizicultura.

A produtividade é o objetivo principal dos programas de melhoramento de plantas, entretanto, caracteres como qualidade industrial e tolerância/ resistência a estresses bióticos e abióticos são fundamentais para o ganho genético na espécie. As plantas, sob condições naturais, estão expostas a vários estresses ambientais que afetam seu metabolismo desencadeando mudanças bioquímicas, celulares e fisiológicas com a finalidade de evitá-los ou tolerá-los. Seca, salinidade, baixas e altas temperaturas, inundação, poluentes e radiação são alguns dos fatores de estresse mais importantes que limitam a produtividade das culturas. Dentre os fatores abióticos, a salinidade dos solos tem se constituído em um dos mais sérios

problemas para a agricultura irrigada em diversas partes do mundo. Segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2008), aproximadamente 20% das terras cultivadas no mundo vêm enfrentando problemas de salinização, enquanto no Brasil, a área afetada pela salinidade corresponde a 2% da área total. No Estado do Rio Grande do Sul, maior produtor de arroz no Brasil, aproximadamente 25% dos solos apresentam teores de salinidade limitantes ao cultivo de arroz irrigado (CARMONA, 2011).

Na região Sul e nas Planícies Costeiras do Rio Grande do Sul, a fonte mais utilizada para irrigação é a Laguna dos Patos que, por ter ligação com o Oceano Atlântico, sofre a sua influência, principalmente em épocas de baixa precipitação pluvial e elevada demanda, tanto atmosférica quanto das próprias lavouras de arroz do seu entorno (CARMONA, 2011).

A tolerância do arroz à salinidade varia conforme o seu estádio de desenvolvimento, em especial o de plântula e reprodutivo. A salinidade pode causar danos irreversíveis, ocasionando diminuição do perfilhamento esterilidade das espiguetas e morte das plantas, enquanto que o maior nível de tolerância se dá durante a germinação, período em que o nível crítico de algumas variedades pode chegar a até 24 dS m^{-1} (DJARAGUIRAM et al., 2003; CARMONA, 2011).

Vários estudos, com diferentes genótipos e em diferentes ambientes e locais, demonstram uma relação linear entre o aumento nos níveis de salinidade e a diminuição do número de perfilhos, além do aumento do número de perfilhos não produtivos (CASTILHO et al., 2007; CARMONA, 2011; BENÍTEZ, 2012). Outras consequências do estresse por sal são: alteração na disponibilidade hídrica, desequilíbrio iônico, distúrbios na integridade das membranas, alterações nos níveis

de reguladores de crescimento, bem como alterações nas atividades metabólicas, incluindo a fotossíntese e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ZHU, 2001; PANDA; KHAN, 2009).

O controle genético da tolerância à salinidade é quantitativo, envolvendo uma rede gênica de vários locos distribuídos em diferentes regiões do genoma do arroz, os quais, uma vez ativados, podem mitigar o efeito do estresse, levando a um ajustamento celular e tolerância da planta. Em estudos com arroz, muitos grupos de pesquisa têm utilizado estratégias que possibilitam identificar um grande número de genes expressos em resposta a diferentes condições de tratamento e/ou condições de estresse, os quais estão depositados em bancos de dados públicos (BENÍTEZ, 2012). No entanto, os resultados obtidos por sequenciamento e/ou microarranjos são muito amplos, sendo necessário que, dentro destes experimentos, alguns genes sejam selecionados como candidatos, os quais devem ser validados em análises mais pontuais para quantificar sua expressão em resposta ao estresse.

Uma das técnicas de biologia molecular amplamente utilizada para a validação dos dados de expressão gênica, pois apresenta sensibilidade e especificidade na análise de transcritos, é a técnica de qRT-PCR (real time quantitative RT-PCR). Esta tecnologia está fundamentada no processo de transcrição reversa (RT) seguida da Reação em Cadeia da DNA-polimerase com a marcação de moléculas fluorescentes covalentemente ligadas aos nucleotídeos dos *amplicons* sintetizados. Os produtos formados são monitorados a cada ciclo, o que permite uma detecção rápida e precisa do cDNA amplificado (GACHON et al., 2004).

Apesar disso, esta técnica necessita de uma uniformização para a correta interpretação dos dados obtidos. A padronização é feita através de um ou mais

genes 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 qRT-PCR (BASTOLLA, 2007).

Considerando que tanto a sequência do gene constitutivo como a sequência do gene de interesse (alvo) estarão presentes na amostra testada, o primeiro não deverá apresentar variação significativa de expressão, pois se trata de um gene de referência e o segundo poderá apresentar diferentes padrões de expressão dentro do experimento (ESPÓSITO-RODRÍGUEZ 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; BASTOLLA, 2007).

Uma das descobertas na área da genômica estrutural de plantas são as proteínas LTPs (“Lipid Transfer Proteins”) que compõem uma família também descrita como “Alpha-Amylase Inhibitors” (AAI), “Lipid Transfer” (LT) e “Seed Storage” (SS), sendo pequenas proteínas de até 10 kDa e abundantes em plantas superiores. Elas são capazes de ligar-se a ácidos graxos e fazer a transferência de fosfolipídios entre membranas (VINCENT-ARONDEL et al., 2000). Inicialmente, as pesquisas haviam sugerido que as LTPs estavam relacionadas tanto com a transferência e ligação de ácidos graxos e fosfolipídios entre as membranas, como quanto na modificação da composição de membrana lipídica e biogênese de membrana (WU et al., 2004, KIRUBAKARAN et al., 2008). Maldonado et al. (2002) descobriram que uma verdadeira LTP apoplástica (DIR1) estava envolvida na produção ou transmissão de um sinal celular essencial e, portanto, propõem-se que

a proteína DIR1 interage com uma molécula de lipídeo promovendo sinalizações a longas distâncias. As LTPs também apresentam atividade antifúngica e desempenham papel vital em respostas de defesa da planta a ataques de patógenos (GOMES et al., 2003). Uma função importante que tem sido atribuída às LTPs inclui o envolvimento destas proteínas em diferentes estresses abióticos. Estudos anteriores demonstram que os genes da família LTP tem expressão tipicamente diferenciada em situações de estresse abiótico (JANG et al*.,* 2002). Os resultados destes estudos revelaram que genes *LTPs* foram diferencialmente regulados por várias condições abióticas, tais como temperatura elevada (OSHINO et al., 2007), estresse por frio (HWANG et al., 2005), estresse salino (FLORENCE et al., 1997; LIU; LIN, 2003; WU et al., 2004; GONORAZKY et al., 2005; CHOI et al., 2008) e estresse por metais pesados (HOLLENBACH et al., 1997). Tratamentos com Ácido abscísico (ABA) também podem induzir a expressão diferenciada dos genes *LTPs* (YUBERO-SERRANO et al., 2003; FEDERICO et al., 2005). Estes resultados indicaram que as *LTPs* desempenham várias funções em uma vasta gama de estresses abióticos. No entanto, a maioria dos estudos tem investigado apenas um ou alguns poucos genes das famílias *LTPs* e, poucos dados estão disponíveis no que diz respeito à expressão gênica destes genes em diferentes tecidos de plantas.

Diante da importância social e econômica da cultura do arroz a nível mundial e para o Brasil, e sabendo-se que, muitas vezes as safras da cultura são prejudicadas pelo excesso de sal existente no solo e na água de irrigação, assim como pela falta de genótipos tolerantes a esta condição ambiental, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão de dez genes constitutivos para identificar normalizadores com expressão estável em arroz submetido ao estresse salino e

comparar a expressão relativa de 11 genes da família *LTPs1* a fim de buscar informações que possam ser utilizadas no auxílio a programas de melhoramento genético para a tolerância a salinidade.

2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTOLLA, FERNANDA. Seleção e avaliação de genes de referência para estudos de expressão gênica em Eucalyptus. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

BENÍTEZ, L.C. Fisiologia do estresse salino em arroz: caracterização da resposta bioquímica e molecular. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-graduação em Fisiologia vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

CARMONA, F.C. Salinidade da água e do solo e sua influência sobre o arroz irrigado. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

CASTILHO, E.G.; TUONG, T.P.; ISMAIL, A.M.; INUBUSHI, K. Response to salinity rice: comparative effects of osmotic and ionic stresses. **Plant Production Science**. V. 10, p. 159-170, 2007.

CHOI, A.M.; LEE, S.B.; CHO, S.H.; HWANG, I.; HUR, C.G.; SUH, M.C. Isolation and characterization of multiple abundant lipid transfer protein isoforms in developing sesame (Sesamum indicum L.) seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, n.46, p.127–139, 2008.

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/. 2013. Acesso em 20 de maio de 2013.

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMAN, T.; UDVARDI M.K.; SCHEIBLE W.R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. **Plant Physiol**. 139:5–17, 2005.

DJANAGUIRAMAN, M.; RAMADASS, R.; DEVI, D.D. Effect of salt stresson germination and seedling growth in rice genotypes. **The Madras Agricultural Journal**. v. 9, p. 50-53,2003.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M.; BORGES, A.A.; BORGES-PÉREZ, A.; PÉREZ, J.A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. BMC Plant Biol. 8:131, 2008.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2008). Extent and Causes Salt-affected Soils in Participating Countries – **Land and Plant nutrition management service.** Disponível em http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/topic2.htm#top. Acesso em 01 de julho de 2013.

FEDERICO, M.L.; KAEPPLER, H.F.; SKADSEN, R.W. The complex developmental expression of a novel stress-responsive barley Ltp gene is determined by a shortened promoter sequence. **Plant Molecular Biology**, n. 57, p.35–51, 2005.

FLORENCE, V.; GERTRUD L.; SUJATA P.; DOMINIQUE T.; FRANCOISE G.; JEAN-CLAUDE K.; PERE P.; MICHEL D. Rice lipid transfer protein (LTP) genes belong to a complex multigene family and are differentially regulated. **Gene**, n. 195, p. 177–186, 1997.

GACHON, C.; MINGAN, A.; CHARRIER, B. Real time PCR: what relevance to plant studies? **Jornal of experimental Botany**, 55 (402): 1445-1454, 2004.

GOMES, E.E.; SAGOT, C.; GAILLARD, L.; LAQUITAINE, B.; POINSSOT, Y.; SANEJOUAND, S.; DELROP AND COUTOS-THE´VENOT, P. Nonspecific lipid transfer protein genes expression in grape (Vitis sp.) cells in response to fungal elicitor treatments. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, n.16, p.456–464, 2003.

GONORAZKY, A.G.; REGENTE, M.C; CANAL, L. de LA. Stress induction and antimicrobial properties of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. **Journal of Plant Physiology**, n.162, p.618–624, 2005.

HOLLENBACH, B.; SCHREIBER, L.; HARTUNG, W.; DIETZ, K.J. Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly. **Planta**, n.203, p.9–19, 1997.

HWANG, E.W.; KIM, K.A.; PARK, S.C.; JEONG, M.J.; BYUN, M.O.; KWON, H.B. Expression profiles of hot pepper (Capsicum annum) genes under cold stress

conditions. **Journal Biosciences**, n.30, p.657–667, 2005.

JANG, C.D.; KIM, S.; BU, J.; KIM, S.; LEE, J.; KIM, J.; JOHNSON AND SEO, Y. Isolation and characterization of lipid transfer protein (LTP) genes from a wheat–rye translocation line. **Plant Cell Report**, n.20, p.961–966, 2002.

KIRUBAKARAN, S.I.; BEGUM, S.M.; ULAGANATHAN, K. AND SAKTHIVEL, N. Characterization of a new antifungal lipid transfer protein from wheat. **Plant Physiology Biochemistry**, n.46, p. 918–927, 2008.

LIU, K.H.; LIN, T.Y. Cloning and characterization of two novel lipid transfer protein I genes in Vigna radiata. DNA Sequence: **the journal of DNA sequencing and mapping**, n.14, p.420–426, 2003.

MALDONADO, A.M.; DOERNER, P.; DIXON, R.A.; LAMB, C.J. AND CAMERON, R.K. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. **Nature**, n.419, p.399–403, 2002.

OSHINO, T.M.; ABIKO, R.; SAITO, E.; ICHIISHI, M.; ENDO, M.; KAWAGISHI-KOBAYASHI, A. Premature progression of anther early developmental programs accompanied by comprehensive alterations in transcription during high-temperature injury in barley plants. **Molecular Genetics Genomics**, n.278, p.31–42, 2007.

PANDA, S.K.; KHAN, M.H.G. Oxidative Damage and Antioxidant Responses in

Greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term Salinity Stress and its Recovery. **Journal Agronomy Crop Science**, v. 195, p. 442-454, 2009.

VINCENT A.; CHANTAL V.; CATHERINE C.; JEAN-CLAUDE K. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in Arabidopsis thaliana. **Plant Science**, n.157, p.1-12, 2000.

WU, G.; ROBERTSON, A.J.; LIU, X.; ZHENG, P.; WILEN, R.W.; NESBITT, N.T. AND GUSTA, L.V. A lipid transfer protein gene BG-14 is differentially regulated by abiotic stress, ABA, anisomycin, and sphingosine in bromegrass (Bromus inermis). **Journal of Plant Physiology**, n.161, p.449–458, 2004.

YUBERO-SERRANO, E.M.; MOYANO, E.; MEDINA-ESCOBAR, N.; MUN˜ OZ-BLANCO, J. AND CABALLERO, J.L. 2003. Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. **J. Exp. Bot**. 54:1865–1877.

ZHU, J.K. Plant salt tolerance. **Trends Plant Science**. V. 6, p. 66-71, 2001.

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

(ISSN 1415-4757 / ISSN 1678-4685)

Seleção de normalizadores para estudos de expressão gênica por qRT-PCR em plântulas de arroz sob estresse salino

Resumo

Para se obter resultados precisos e confiáveis da expressão de genes de interesse através da técnica de qRT-PCR, é necessária a normalização dos dados pela comparação com genes constitutivos que apresentem níveis de expressão uniforme nas condições experimentais avaliadas. Neste trabalho foi avaliado a estabilidade de expressão de dez genes candidatos a normalizadores, incluindo: *ACT11*, *β-TUB*, *Eef-1*, *UBC-E2*, *eIF-4α*, *UBQ10*, *UBQ5*, *GAPDH*, *TIP41-LIKE* e *Cyclophilin*, em folhas de arroz (*Oryza sativa* L.) dos genótipos BRS Bojuru e BRS Ligeirinho submetidas a estresse salino na concentração de 150 mM, durante cinco dias. Após a análise dos níveis de expressão, baseada na análise de variância e programas geNorm, NormFinder, BestKeeper e Método Comparativo de C_T, observou-se que o *UBQ10* foi o mais estável em todos os tratamentos analisados. Por outro lado, os genes *eIF-4α*, *TIP41-LIKE* e *Cyclophilin*, apresentaram os maiores coeficientes de variação total, 269; 169 e 179, respectivamente, sendo, portanto os genes com expressão menos estável. Assim, diante do exposto, conclui-se que o gene *UBQ10* é o melhor normalizador para ser usado em reações de qRT-PCR nas condições experimentais estudadas.

Palavras chave: *Oryza sativa* L., Salinidade, Ubiquitina, PCR quantitativa em tempo real

Introdução

Assim como toda cultura agrícola, a produção de arroz pode ser fortemente influenciada por um grande número de fatores ambientais. Dentre os fatores abióticos, a salinidade dos solos e da água de irrigação constitui um dos principais problemas para a agricultura irrigada em diversas partes do mundo. Segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2008), aproximadamente 20% das terras cultivadas no mundo vêm enfrentando problemas de salinização, enquanto que no Estado do Rio Grande do Sul, maior produtor de arroz no Brasil, aproximadamente 25% dos solos apresentam teores de sal limitantes ao cultivo de arroz irrigado (Carmona, 2011).

Fisiologicamente, o estresse salino inibe o crescimento e desenvolvimento das plantas, reduzindo o potencial osmótico da solução do solo, restringindo a disponibilidade da água e/ou acumulando íons em excesso nos tecidos vegetais, podendo ocasionar toxicidade iônica, desequilíbrio nutricional, ou ambos (Tester e Davenport, 2003). Outras consequências da salinidade podem ser: distúrbios na integridade das membranas, alterações nos níveis de reguladores de crescimento, nas atividades metabólicas, incluindo a fotossíntese, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, mudanças nas concentrações de carboidratos solúveis totais, fenóis totais, glicina betaína, prolina, clorofila e proteínas (Panda e Khan, 2009).

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. Em arroz, existem muitos estudos utilizando estratégias que possibilitam identificar um grande número de genes expressos em resposta a diferentes condições de tratamento e/ou condições de estresse (Cotsaftis *et*

al., 2011; Walia *et al*., 2005), entretanto 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.

Uma das técnicas de biologia molecular amplamente utilizada para a validação dos dados de expressão gênica é a técnica de qRT-PCR (*quantitative RT-PCR*), pois apresenta sensibilidade e reprodutibilidade na análise de transcritos. A técnica está fundamentada no processo de transcrição reversa (RT) seguida da Reação em Cadeia da DNA-polimerase com a marcação de moléculas fluorescentes covalentemente ligadas aos nucleotídeos dos *amplicons* sintetizados. Os produtos formados são monitorados a cada ciclo da reação, permitindo uma detecção rápida e precisa do cDNA amplificado (Gachon *et al*., 2004).

No entanto, esta técnica necessita de uma 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 qRT-PCR (Bastolla, 2007).

Considerando que tanto a sequência do gene constitutivo como a sequência do gene de interesse (alvo) estarão presentes na amostra testada, o primeiro não deverá apresentar variação significativa de expressão, pois se trata de um gene de referência e o segundo poderá apresentar diferentes padrões de expressão dentro do experimento (Expósito-Rodríguez *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; Bastolla, 2007).

Embora vários genes sejam costumeiramente utilizados e relatados como bons

normalizadores, em estudos com plantas, os codificadores do rRNA 18S (*18S rRNA*), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), Fator de alongamento 1α (*EF-1α*), Actina (*ACT*) e α Tubulina (*α-TUB*) (Czechowski *et al*., 2005), têm demonstrado que podem apresentar expressão diferencial entre tecidos, genótipos e condições de ambiente testadas (Brunner *et al*., 2004; Czechowski *et al*., 2005; Gutierrez *et al*., 2008 e Expósito-Rodríguez *et al*., 2008).

Com o intuito de avaliar a estabilidade de expressão de genes normalizadores, vários algoritimos foram desenvolvidos nos últimos anos, dentre eles aqueles usados nos programas geNorm, NormFinder, BestKeeper e o método comparativo de C_T (Silver *et al*., 2006). O algoritimo do programa geNorm indica dois genes normalizadores mais estáveis ou a combinação múltipla de vários genes estáveis calculando a estabilidade média de expressão (M) baseado na média aritmética do número de genes candidatos a normalizadores comparados par a par (Vandesompele *et al*., 2002). Esta ferramenta utiliza o princípio de que a razão da expressão de dois genes normalizadores perfeitos deve ser constante através dos diferentes tratamentos experimentais.

O algoritimo 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 da variância (Andersen *et al*., 2004). O algoritimo do programa BestKeeper determina os melhores genes normalizadores utilizando os valores do desvio padrão e coeficiente de variação. A partir destes dados, é calculada a variância intrínsica de expressão, a qual é utilizada para a análise de correlação pareada entre os genes, sendo considerado o melhor normalizador, o gene com menor variação intrínsica (Pfaffl *et al*., 2004). O método comparativo do ΔC_T avalia o gene mais estável comparando a expressão relativa de pares de genes, dentro de cada tratamento, medindo a estabilidade de um

gene, pela média dos valores do desvio padrão derivados da comparação entre um gene normalizador e os outros genes candidatos (Silver *et al*., 2006) .

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão de dez genes constitutivos e identificar normalizadores com expressão estável para estudos de expressão gênica por qRT-PCR em plântulas de arroz sob estresse salino.

Material e Métodos

Material Vegetal e Condições Experimentais

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) dos genótipos BRS Bojuru (tolerante ao sal) e BRS Ligeirinho (sensível ao sal) foram desinfestadas com hipoclorito 1%, colocadas para germinar sobre papel *Germitest* em caixas *Gerbox*, e mantidas em câmara de crescimento do tipo "Biological Organism Development" (BOD) com fotoperíodo de 12h a 25±2°C, durante 10 dias. Após este período as plântulas foram transferidas para potes plásticos (500 mL) contendo como substrato areia previamente lavada com solução de ácido clorídrico 1%, e irrigadas, alternadamente a cada dois dias, com água e solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1938), em casa de vegetação.

Ao atingirem o estádio de desenvolvimento V_4, as plantas foram submetidas à irrigação alternada, com solução nutritiva e água contendo NaCl na concentração de 150 mM (100 mL/pote). A concentração de NaCl utilizada foi escolhida com base em dados depositados na literatura para experimentos com estresse salino em arroz (Hong *et al*., 2007).

A coleta das folhas para as análises foi realizada durante cinco dias com intervalos de 24 horas e denominadas, C1, C2, C3, C4 e C5, onde: C1= plantas não expostas ao estresse (controle); C2=24 horas de estresse; C3=48 horas de estresse;

C4=72 horas de estresse; C5=96 horas de estresse. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 2 x 5 (2 genótipos x 5 tempos de exposição ao sal) e três repetições biológicas, sendo cada repetição composta por três potes contendo 5 plantas.

Extração de RNA Total e Síntese de cDNA

O RNA total foi extraído a partir de 100mg de folhas, de acordo com o método descrito para o reagente *Plant RNA Reagent Purilink*®. A quantidade e pureza de RNA foram mensuradas em NanoDrop ND-1000, enquanto que a qualidade e integridade do RNA foram verificadas em eletroforese com gel de agarose 1,0%. Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa a partir de 2 µg de RNA total utilizando *primer* oligoDT e *Kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen®-18080093).

Escolha dos genes normalizadores

Foram selecionados como possíveis normalizadores dez genes, citados na literatura em trabalhos com arroz, utilizados como controle interno nas análises de qRT-PCR e que, supostamente, não apresentam variação significativa entre os tratamentos analisados. Os genes selecionados foram: *ACT11, UBC-E2, Fator alongamento eucariótico 1-α, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, β-Tubulina, Fator de iniciação eucariótica 4a, Ubiquitina10, Ubiquitina5, Aquaporina TIP41 e Ciclofilina* (Tabela 1).

Especificidade e Curva Padrão de Eficiência

A especificidade e curva padrão de eficiência dos *primers* foram avaliadas a partir de um *pool* de 15 cDNAs (5 tempos x 3 repetições) para cada genótipo.

Inicialmente, foi verificada, através da curva de dissociação (*melting curve*) especificidade de cada conjunto de *primer*, sendo mantidos neste estudo somente aqueles *primers* com *amplicons* específicos, ou seja, com um único pico de dissociação das fitas dos produtos da PCR.

A eficiência da PCR (E) 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 $E = 10^{(-1/slope)}$ (Rasmussen, 2001), onde o *slope* corresponde à inclinação da reta obtida da regressão entre os valores de C_T (*Cycle Threshold*) dos transcritos e os valores do logaritmo das diferentes diluições de cDNA (curva padrão de eficiência), sendo considerados aceitáveis valores de eficiência entre 1,8 e 2,2, o que corresponde a uma eficiência da reação entre 90-110%. Todos os *primers* funcionaram a uma temperatura de anelamento de 60°C e as reações foram feitas em triplicata para cada diluição de cDNA.

Estabilidade do Normalizador

Para verificar a estabilidade dos normalizadores foram comparadas as alterações nos níveis de expressão nas amostras com 24, 48, 72 e 96 horas de exposição ao estresse em relação às amostras controle (sem estresse). A fórmula utilizada para o cálculo da estabilidade foi semelhante à proposta por Chao *et al*. (2012), onde :

$\Delta C_{Tamostra N} = C_{Tamostra N} - C_{Tcontrole.}$ Por exemplo: $\Delta C_{Tamostra 24} = C_{Tamostra 24} - C_{Tcontrole}$.

A partir dos valores de ΔC_T obtidos foram calculados os valores de Quantificação Relativa (QR), através da seguinte modificação na fórmula original $QR=2^{-(\Delta\Delta CT)}$ (Pfaffl *et al*., 2002) para $QR=2^{-(\Delta CT)}$, os quais foram submetidos à análise de variância (*proc glm*) para testar possíveis variações para os fatores, tempos de exposição ao sal e genótipo, de maneira isolada, bem como a interação entre ambos,

sendo considerados significativos fatores do teste *F* com valores de $P \leq 0{,}05$. Posteriormente, através da rotina *proc univariate*, foram obtidas informações adicionais referentes à média geral ($\overline{X}$), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%) nos diferentes genótipos e desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%) total de cada gene candidato a normalizador. As análises foram realizadas no *SAS* v.9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Foram considerados estáveis aqueles genes normalizadores cuja análise de variância não detectou diferença significativa para o fator tempo de exposição ao sal e ausência de interação, bem como, aqueles genes com menores valores de desvio padrão e coeficiente de variação.

Paralelamente às análises estatísticas, a estabilidade dos normalizadores para ambos os genótipos, foi avaliada através da ferramenta RefFinder disponível no site http://www.leonxie.com/**,** a qual integra os algoritimos computacionais geNorm, NormFinder, BestKeeper e o método comparativo do ΔC_T para comparar e classificar a estabilidade dos genes candidatos a normalizadores. Os valores de C_T de cada gene foram utilizados por estes algoritimos para determinar a estabilidade de expressão relativa dos mesmos. Destes quatro algoritimos, geNorm e NormFinder usam os valores de expressão relativa calculados a partir dos valores de C_T, enquanto que BestKeeper e o método comparativo do ΔC_T usam diretamente os valores de C_T inseridos no RefFinder (Chao *et al*., 2012). Além da análise separada em cada algoritmo utilizado, uma classificação geral do melhor normalizador para a condição experimental testada foi obtida através de uma combinação dos resultados dos quatro algoritimos. Os cálculos detalhados de cada um dos métodos encontram-se descritos em Chen *et al*. (2011).

Reações de qRT-PCR

O volume total das reações de qRT-PCR foi de 12 µl, sendo 6,25 µl do fluoróforo SYBR Green (Applied Biosystems®), 0,25 µl (10 mM) de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 1 µL de cDNA (diluição 1:25, previamente definida) e 4,25 µl de água ultra pura. As reações foram realizadas em Termociclador Bio-Rad CFX Real Time, utilizando-se os seguintes parâmetros de amplificação: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto com inserção da curva de *melting* de 65 a 95°C, com incremento de 5°C a cada medida de fluorescência. Para cada repetição biológica foram feitas três repetições técnicas (triplicatas).

Tabela 1. Descrição dos genes candidatos a normalizadores para reações de qRT-PCR em plantas de arroz, sob estresse salino

GENE	DESCRIÇÃO	ACESSO	PRIMER F	PRIMER R	BIBLIOGRAFIA
ACT11	Actina 11	AK100267	5'-CAGCCACACTGTCCCCATCTA-3'	5'-AGCAAGGTCGAGACGAAGGA-3'	Zhang *et al*. (2009)
β-Tubulina	Beta-tubulina	AK072502	5'-GCTGACCACACCTAGCTTTGG-3'	5'-AGGGAACCTTAGGCAGCATGT-3'	Zhang *et al*. (2009)
Eef-1α	Fator de alongamento de Eucarioto 1-α	AK061464	5'-TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT-3'	5'-GACTTCCTTCACGATTTCATCGTAA-3'	Zhang *et al*. (2009)
UBC -E2	Ubiquitina-conjugada enzima E2	AK059694	5'-CCGTTTGTAGAGCCATAATTGCA-3'	5'-AGGTTGCCTGAGTCACAGTTAAGTG-3'	Jain *et al*, (2006)
eIF-4-a	Fator de iniciação de eucarioto 4-α	AK073620	5'-TTGTGCTGGATGAAGCTGATG-3'	5'-GGAAGGAGCTGGAAGATATCATAGA-3'	Jain *et al*. (2006)
UBQ10	Ubiquitina 10	AK101547	5'-TGGTCAGTAATCAGCCAGTTTGG-3'	5'-GCACCACAAATACTTGACGAACAG-3'	Jain *et al*. (2006)
UBQ5	Ubiquitina5	AK061988	5'-ACCACTTCGACCGCCACTACT-3'	5'-ACGCCTAAGCCTGCTGGTT-3	Jain *et al*. (2006)
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	AK064960	5'-AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT-3'	5'-CGTAACCCAGAATACCCTTGAGTTT-3'	Jain *et al*. (2006)
TIP41 – Like	Aquaporina	AK103511	5'-GTTTGGATGAACCCCGCAA-3'	5'-GGCAACAAGGTCAATCCGATC-3'	Caldana *et al*. (2007)
Cyclophilin	Isomerase	AK121304	5'CCACCATCACAGATCGGATCTT-3'	5'-GCGGTCAGAGCGAAAGTAGCTA-3'	Caldana *et al*. (2007)

Resultados

A especificidade da amplificação é determinada pela presença de um único pico presente na curva de dissociação (*Melting*). Nesta curva analisa-se, ao final da reação, a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, sendo que cada *amplicon* possui uma temperatura de fusão específica, o que possibilita diferenciar os produtos resultantes da PCR. As curvas de dissociação apresentadas nas Figuras 1 e 2 demonstram que, após 40 ciclos de amplificação, todos os *primers* utilizados neste estudo possuem um pico único bastante definido, confirmando especificidade do produto amplificado.

A eficiência de amplificação dos *primers* foi calculada individualmente a partir do Logaritmo (Log) das diluições de cDNA, para cada uma dos genótipos. As análises demonstraram eficiências próximas a 100%, variando entre 1,85 e 2,16, indicando que ao final de cada ciclo, o transcrito molde é duplicado, com variação de 10%, o que não interfere significativamente nos resultados obtidos (Figuras 1 e 2).

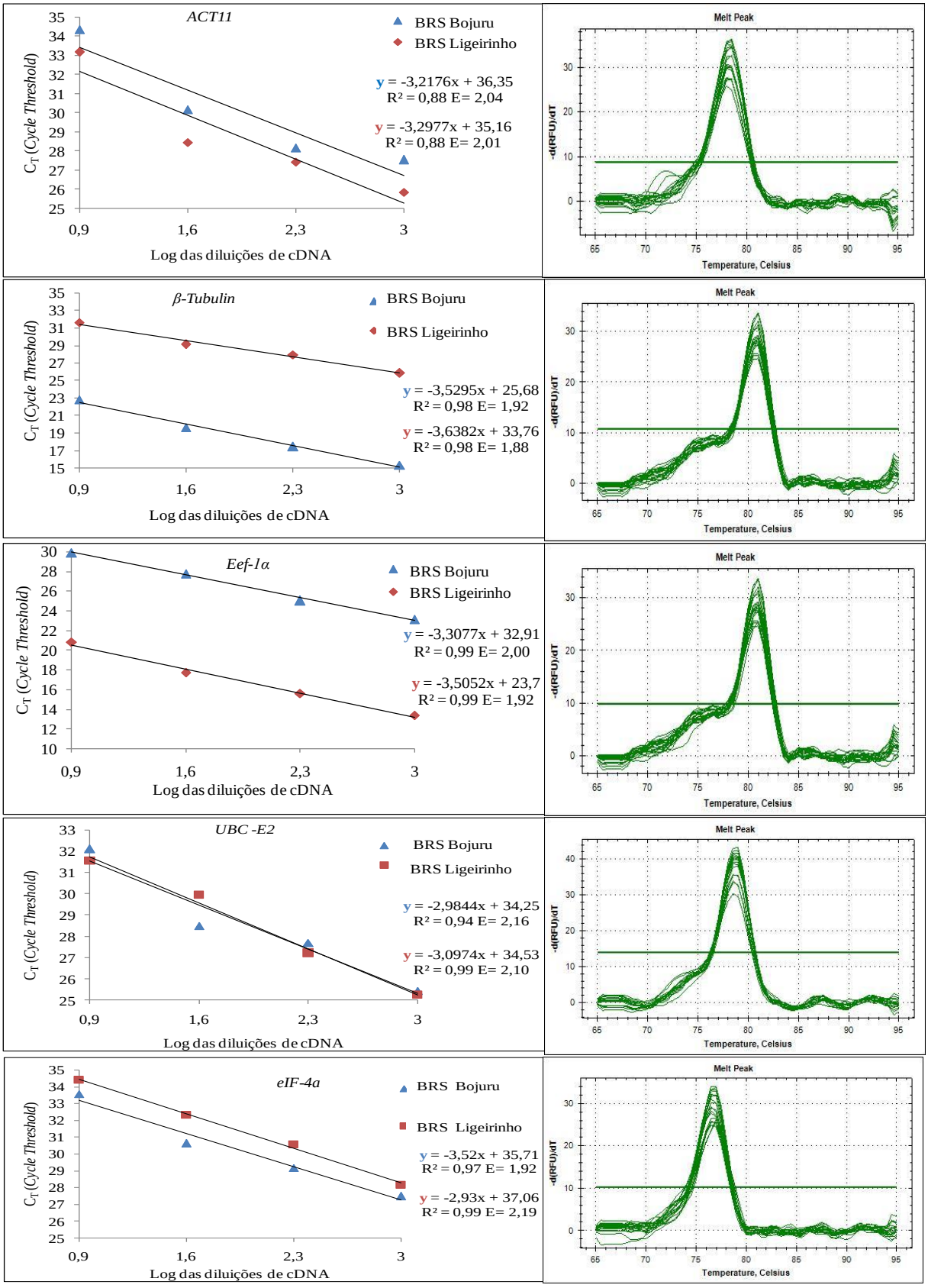

Figura 1. Especificidade e eficiência dos *primers ACT11*, *β-Tubulina*, *Eef-1α, UBC -E2* e *eIF-4*-a, testados para os genótipos, BRS Bojuru (tolerante) e BRS Ligeirinho (sensível).

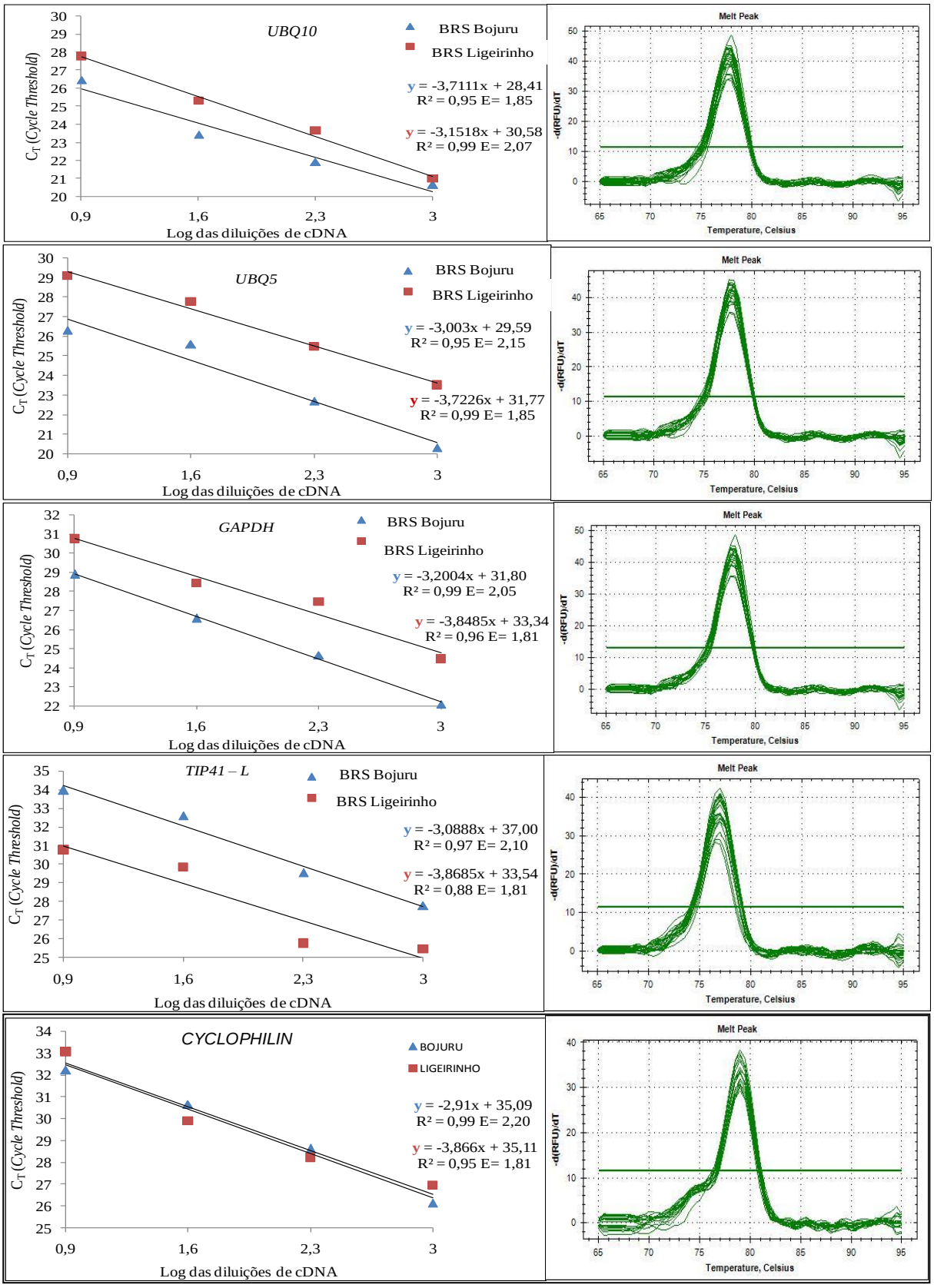

Figura 2. Especificidade e eficiência dos *primers UBQ10, UBQ5, GAPDH, TIP41-Like* e *Cyclophilin*, testados para os genótipos, BRS Bojuru (tolerante) e BRS Ligeirinho (sensível).

De acordo com a análise de variância, houve interação significativa, bem como, efeito isolado dos fatores (tempos de exposição ao sal e genótipos) para os genes *Eef-1α, eIF-4α, GAPDH, TIP41 – Like* e *Cyclophilin*, demonstrando que estes genes apresentam variação nos valores de QR de acordo com o tempo de exposição ao estresse e genótipo estudado. Para o gene *UBC -E2* foi observado efeito significativo apenas para o fator qualitativo (genótipo), enquanto que para os genes *ACT11, β-Tubulina,, UBQ10 e UBQ5* não foi observada significância para nenhum dos fatores.

A partir dos dados apresentados na Tabela 2, referentes aos valores de Desvio Padrão (DP) e Coeficiente de Variação (CV%), observou-se que, dentre os genes testados, *UBQ10* é o que apresenta os menores valores de DP total (0,18) e CV% total (18,52), seguido pela *UBQ5* e *ACT11*, indicando maior estabilidade de expressão destes genes. Por outro lado, para *TIP41-Like*, *Eif-4α* e *Cyclophilin* foram observados valores de DP entre 9,10 e 10,10 e de CV% entre 169,22 e 269,00. Somado a isso, foi possível inferir que há uma maior variação na estabilidade da expressão dos genes no genótipo BRS Ligeirinho, sensível ao estresse salino, com exceção do gene *Eef-1α*, para o qual os valores de desvio padrão foram maiores no genótipo BRS Bojuru (Figura 3).

Tabela 2. Média geral ($\bar{X}$), Desvio Padão (DP) e Coeficiênte de Variação (CV%) de dez genes candidatos a normalizadores, para os genótipos, BRS Bojuru e BRS Ligeirinho, submetidos a cinco tempos de exposição a 150 mM de NaCl

		ACT11	*β-TUB*	*Eef-1α*	*UBC -E2*	*eIF-4α*	*UBQ10*	*UBQ5*	*GAPDH*	*TIP41-*	*C yclophilin*
$\bar{X}$	BRS Bojuru	1,08	1,11	1,32	0,81	0,76	0,97	0,91	0,46	0,77	1,04
	BRS Ligeirinho	1,23	1,03	0,66	1,58	7,28	0,90	1,078	1,71	11,17	9,11
	$\bar{X}$ geral	1,15	1,07	0,99	0,90	4,02	0,94	0,998	1,09	5,97	5,07
DP	BRS Bojuru	0,38	0,46	1,67	0,17	0,33	0,15	0,17	0,35	0,29	0,29
	BRS Ligeirinho	0,31	0,30	0,33	0,91	14,82	0,19	0,23	1,57	12,39	11,68
	DP total	0,35	0,39	1,23	0,75	10,00	0,18	0,22	1,29	10,10	9,10
CV%	BRS Bojuru	35,19	41,89	126,0	21,75	43,38	15,35	18,78	76,75	31,37	23,71
	BRS Ligeirinho	25,62	29,83	49,60	57,55	203,0	21,35	21,87	91,91	110,92	128,22
	CV total	30,41	36,44	123,9	63,04	269,0	18,52	21,91	118,22	169,22	179,22

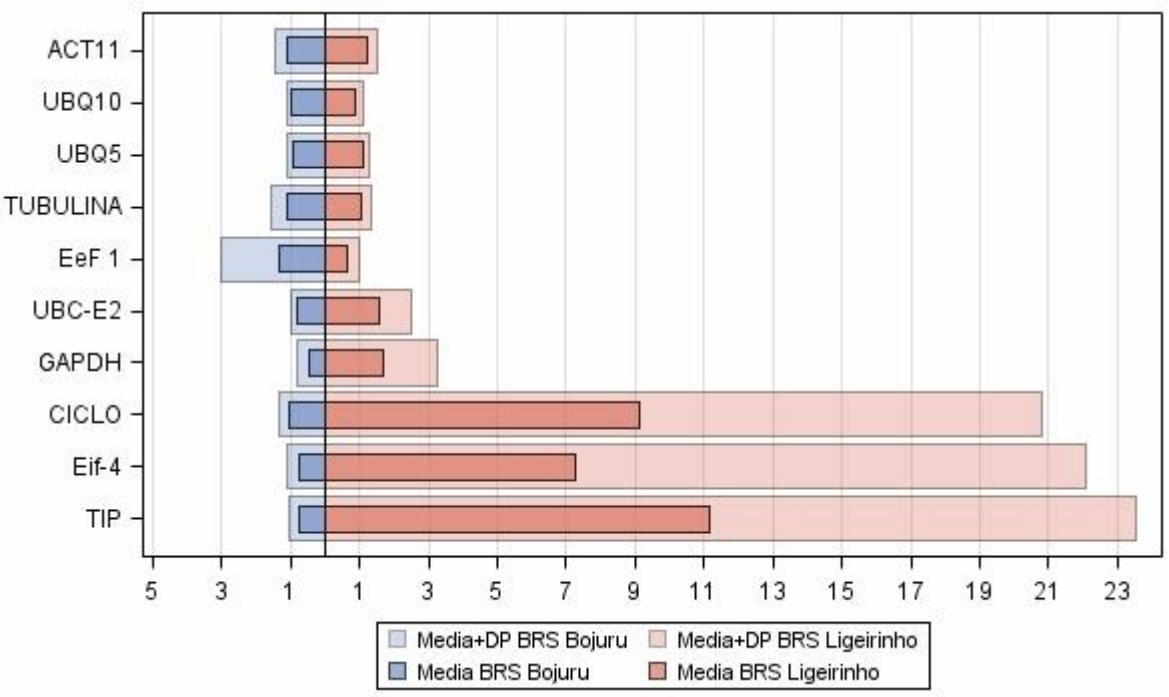

Figura 3. Quantificação relativa (QR) e Desvio Padrão (DP) de dez genes candidatos a normalizadores, para os genótipos, BRS Bojuru e BRS Ligeirinho, submetidos a cinco tempos de exposição a 150 mM de NaCl.

Para avaliar a estabilidade de expressão dos genes candidatos a normalizadores, além da análise de variância também foi calculada e comparada a estabilidade média de expressão (M) utilizando os algorítmos dos programas NormFinder, geNorm, BestKeeper e o método comparativo de C_T.

O programa geNorm, 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 dez genes, mostrados na Figura 4, observou-se que *ACT11*/*UBQ10* (M=0,504) são os genes mais estáveis, seguidos de *β-Tubulin* (M=0,598) e *GAPDH* (M=1,177), *eIF-4a* (M=1,315) e *Cyclophilin* (M=1,495), como os mais variáveis.

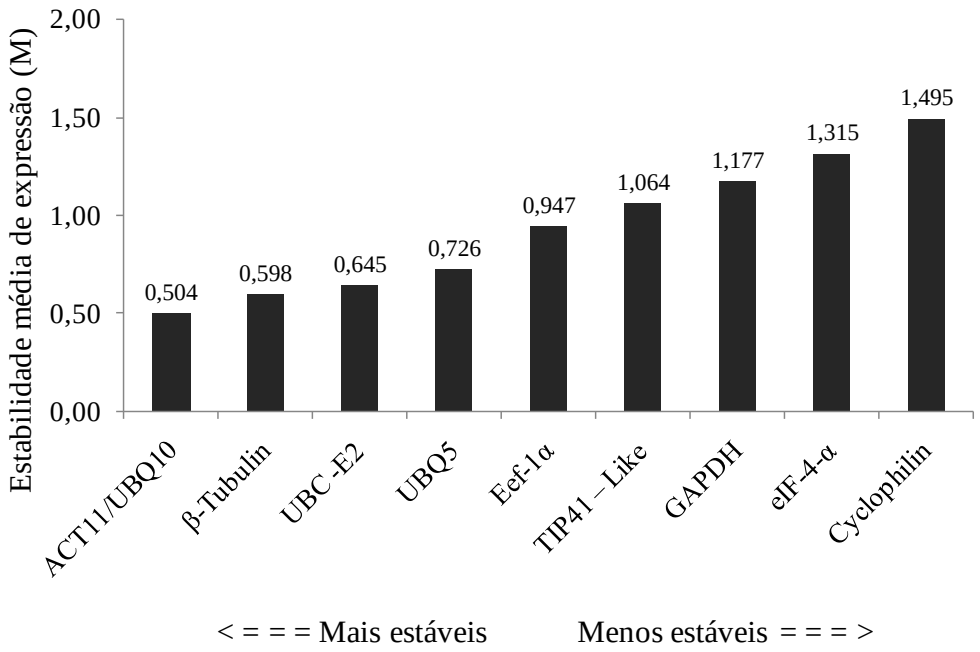

Figura 4. Estabilidade média de expressão (M) de acordo com o algoritimo geNorm de dez genes candidatos a normalizadores para os genótipos de arroz, BRS Bojuru e BRS Ligeirinho, submetidos a cinco tempos de exposição a 150 mM de NaCl.

De acordo com o algoritimo do programa NormFinder (Figura 5) o gene candidato que possui menor valor de M é *UBQ10,* com M=0,327, seguido de M=0,580 e 0,613 para *UBC-E2* e *ACT11*, respectivamente. Os maiores valores de M ficaram com *Cyclophilin* (M=2,021) seguido *eIF-4a* (M=1,583) *e TIP41-Li*ke (M=1,344). Estes dados são semelhantes aos encontrados na análise de variância e geNorm, o que se justifica pelo fato de que todas estas análises levaram em consideração os valores de expressão relativa calculados a partir dos valores de C_T.

A determinação de um gene normalizador adequado para estudo de expressão gênica é o primeiro passo que permite a análise do padrão de expressão relativa de genes alvo de interesse em um dado experimento, conferindo um caráter mais confiável aos resultados obtidos.

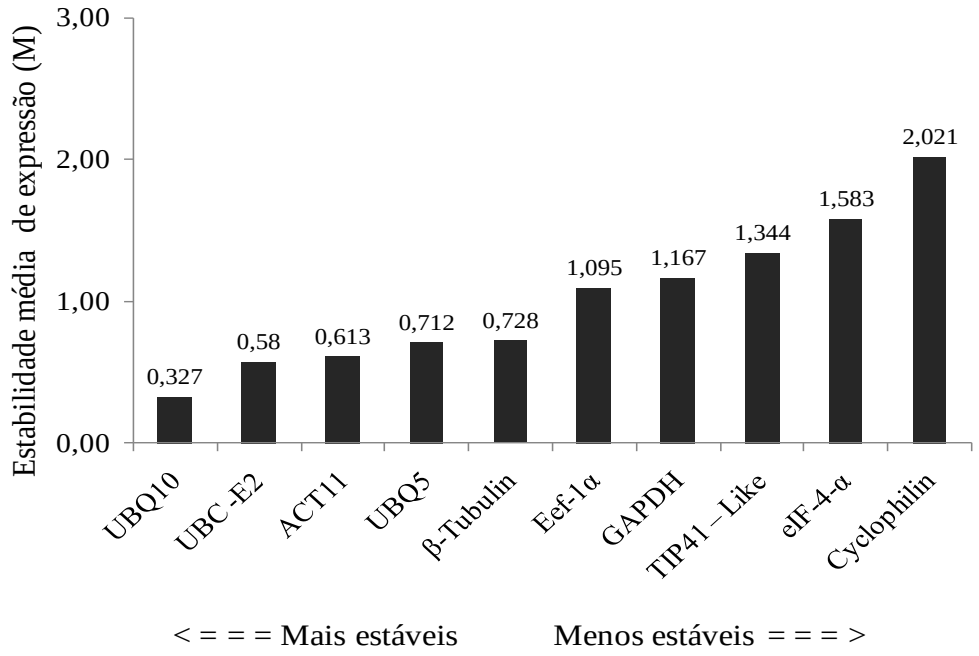

Figura 5. Estabilidade média de expressão (M) de acordo com o algoritimo NormFinder de dez genes candidatos a normalizadores para os genótipos de arroz, BRS Bojuru e BRS Ligeirinho, submetidos a cinco tempos de exposição a 150 mM de NaCl.

O método comparativo de C_T (Figura 6), apresentou uma ordem de estabilidade de expressão igual ao algoritimo NormFinder, para os três primeiros e três últimos genes candidatos a normalizadores, porém o mesmo apresentou valores de M diferentes para cada gene, variando de M=1,13 (*UBQ10*) a 2,21 (*Cyclophilin*).

O algoritimo do programa BestKeeper demonstrou um padrão de estabilidade de expressão semelhante aos demais algoritimos, apontando *ACT11* e *UBQ10* como os genes mais estáveis e *Cyclophilin* seguido de *eIF-4α* como os menos estáveis. No entanto, a ordem de estabilidade dos demais genes apresentou-se alterada. O gene *UBQ5*, indicado como o quarto gene mais estável nas análises do geNorm e NormFinder e quinto no método comparativo de C_T, na análise de BestKeeper ocupou a sétima posição (Figura 7).

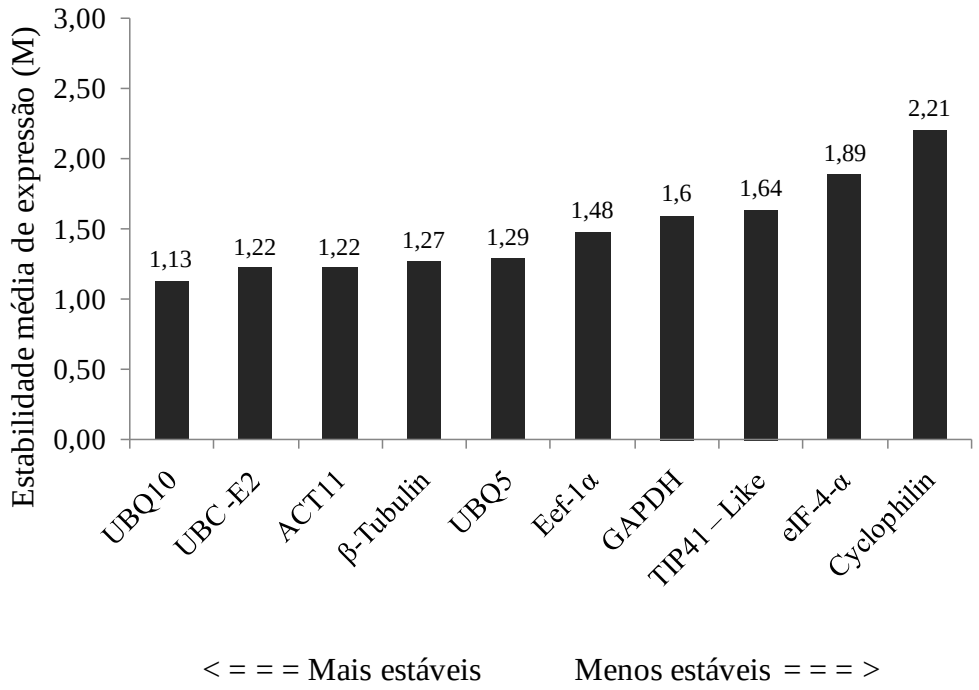

Figura 6. Estabilidade média de expressão (M) de acordo com o Método Comparativo de C_T de dez genes candidatos a normalizadores para os genótipos de arroz, BRS Bojuru e BRS Ligeirinho, submetidos a cinco tempos de exposição a 150 mM de NaCl.

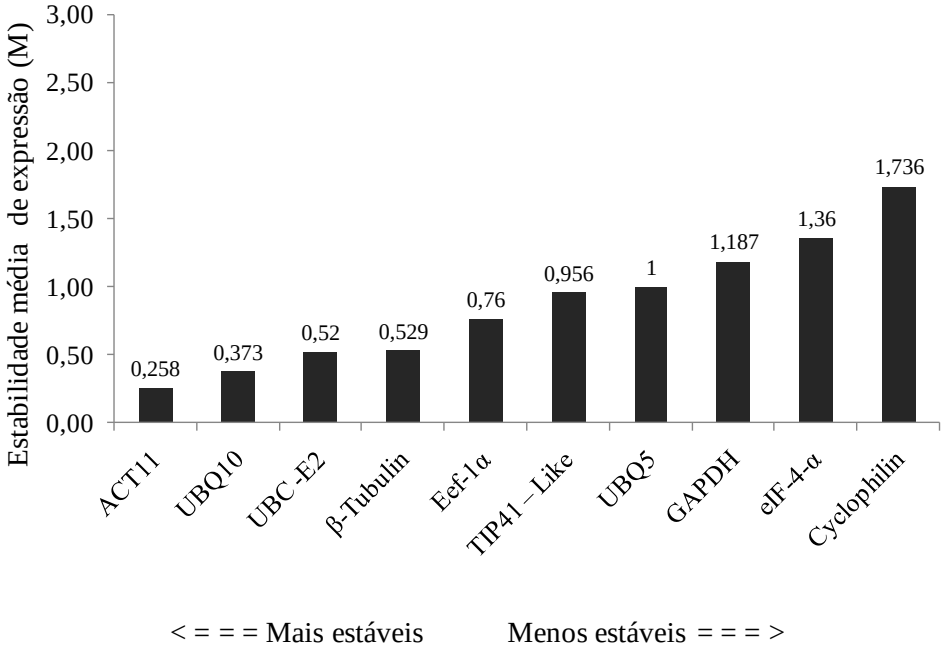

Figura 7. Estabilidade média de expressão (M) de acordo com o algoritimo BestKeeper de dez genes candidatos a normalizadores para os genótipos de arroz, BRS Bojuru e BRS Ligeirinho, submetidos a cinco tempos de exposição a 150 mM de NaCl.

Além da análise separada em cada algoritmo utilizado, uma classificação geral do

melhor normalizador para a condição experimental testada foi obtida através de uma combinação dos resultados dos quatro algoritimos (Figura 8). Esta classificação geral corrobora as classificações obtidas nas demais análises, sendo os genes *ACT11* e *UBQ10* os mais estáveis e *eIF-4a* e *Cyclophilin* os menos estáveis para a análise da expressão relativa de genes em folhas de arroz submetidas ao estresse salino.

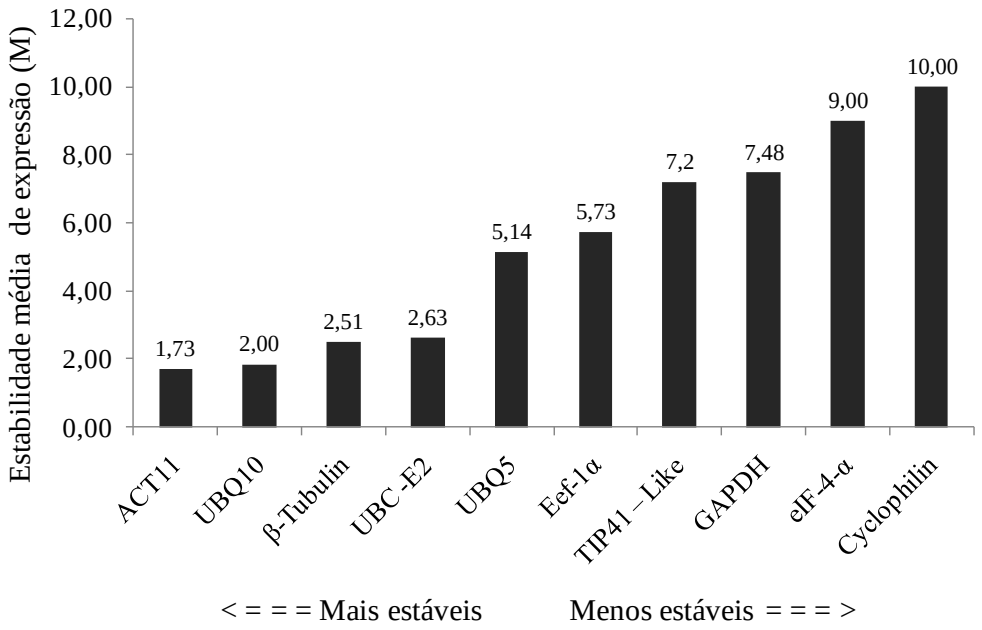

Figura 8. Estabilidade média de expressão (M) de acordo com a combinação dos algoritimos geNorm, NormFinder, Método Comparativo de C_T e BestKeeper, de dez genes candidatos a normalizadores, para os genótipos de arroz, BRS Bojuru e BRS Ligeirinho, submetidos a cinco tempos de exposição a 150 mM de NaCl.

Discussão

No âmbito da análise da expressão gênica, a técnica de qRT-PCR tem se tornado um dos principais métodos para pesquisas no perfil de expressão gênica (Gachon *et al*., 2004). No entanto, para uma correta interpretação dos dados analisados, uma normalização eficiente torna-se condição para a confiabilidade dos resultados, especialmente na verificação da relevância biológica de pequenas diferenças ou no estudo de amostras de diferentes tecidos ou órgãos (Expósito-Rodriguez *et al*., 2008; Guénin *et al*., 2009; Gutierrez *et al*., 2008; Almeida, 2009).

Muitos genes são costumeiramente conhecidos como constitutivos e consequentemente muito utilizados como normalizadores em análises de qRT-PCR. Contudo, mesmo genes envolvidos em processos básicos do metabolismo celular podem apresentar variações significativas de expressão, não sendo assim adequados para a utilização como controle interno de determinadas situações (Czechowski *et al*., 2005; Bastola *et al*., 2007; Guénin *et al*., 2008; Gutierrez *et al*., 2008; Almeida, 2009). O gene normalizador ideal deve ter expressão semelhante, independentemente das condições experimentais, incluindo diferentes tipos de tecidos, estádios de desenvolvimento, e/ou tratamentos experimentais. Diante das preocupações quanto à escolha de genes normalizadores estáveis, este trabalho analisou o padrão de expressão de dez genes candidatos a normalizadores em folhas de plantas de arroz ao longo de cinco tempos de exposição ao sal na concentração de 150 mM.

A actina é a proteína intracelular mais abundante nas células eucarióticas e estas estão em maior concentração no córtex celular. Genes que codificam actina são habitualmente utilizados como normalizadores em muitos estudos de expressão (Jain *et al*., 2006; Caldana *et al*., 2007). No presente estudo, o gene *ACT11* apresentou um padrão de expressão relativamente estável, sendo, juntamente com *UBQ10*, considerado um dos mais indicados para as condições experimentais testadas. Estes dados estão de acordo com os encontrados por Caldana *et al*. (2007), os quais ao analisarem o perfil de expressão de fatores de transcrição de arroz, identificaram o gene *ACT1*(AK071586) como um dos mais estáveis para experimentos com estresse salino. Por outro lado, Nicot *et al*. (2005), observaram variações significativas para o mesmo gene em *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.

A tubulina é uma proteína heterodimérica composta por duas subunidades altamente conservadas, α e β (Whittaker *et al*., 1999), sendo o principal componente estrutural dos microtúbulos de células eucarióticas. Estes microtúbulos desempenham papel crucial em vários processos básicos como divisão celular, transporte intracelular, movimento celular,

morfogênese e manutenção do formato da célula (Ludwig *et al*., 1987; Whittaker *et al*., 1999). Embora esteja envolvida em processos celulares essenciais, a tubulina pode não apresentar um padrão constitutivo em todas as espécies.

De acordo com os resultados obtidos, o gene *β-Tubulin* apresentou-se entre os cinco mais estáveis, com valores de DP total= 0,39 e CV% total=36,44. Neste mesmo sentido, Brunner *et al*. (2004), em estudo com plantas do gênero *Populus*, obteve bons resultados utilizando genes de tubulina como normalizadores. Por outro lado, Expósito-Rodriguez *et al*. (2008), identificaram os genes de tubulina como os mais instáveis em estudos com diferentes órgãos e estádios de desenvolvimento em *Solanum lycopersicum*. Avaliados em conjunto, estes resultados levam a sugerir que os genes constitutivos podem ser regulados de forma diferenciada em diferentes espécies de plantas. Assim, um gene normalizador, com uma expressão estável em um organismo, pode não ser adequado para a normalização da expressão de genes em outro organismo, sob um dado conjunto de condições, sendo necessária sua validação antes de ser utilizado (Jain *et al*., 2006).

As ubiquitinas são proteínas altamente conservadas nos eucariotos e estão envolvidas em complexos de sinalização de outras proteínas (Sun *et al*., 1997), além de participarem na estrutura e transcrição da cromatina, na reparação de DNA, regulação da endocitose e tráfego de proteínas (Hernandez-Garcia *et al*., 2009). Dentre os genes analisados neste trabalho com estresse salino, os codificadores de ubiquitina (*UBQ10 e UBC-E2*) apresentaram-se entre os três mais estáveis nas análises utilizando os algoritmos geNorm, NormFinder, BestKeeper e Método Comparativo de C_T. De acordo com Gutierrez *et al*. (2008), os valores de estabilidade média de expressão (M), obtidos nestes algoritimos, para serem considerados estáveis precisam de M<0,5. Esta afirmação indica o gene *UBQ10* como o mais indicado a ser utilizado como normalizador para análises de qRT-PCR, em folhas de plantas de arroz submetidas a 150 mm de NaCl, uma vez que os valores de M para este gene foram de 0,504;

0,327 e 0,373 nos cálculos com os algoritimos geNorm, NormFinder e BestKeeper, respectivamente. Além disso, este gene apresentou os menores valore de DP e CV% para ambos os genótipos de arroz, BRS Bojuru e BRS Ligeirinho. Além disso, corroborando os dados obtidos, Tong *et al*. (2009), ao investigarem a expressão de 11 genes de referência, em diferentes amostras de *Prunus persica*, verificaram que os genes que codificam o fator de alongamento de tradução 2 (*TEF2*) e ubiquitina 10 (*UBQ10*) apresentam expressão estável e podem ser utilizados como normalizadores nesta espécie.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma enzima chave na glicólise, convertendo gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato com a concomitante redução de NAD^+ a $NADH_2$. Em plantas, a glicólise ocorre tanto no citossol como nos plastídeos e é um processo fundamental na geração de ATP (Muñoz-Bertomeu *et al*., 2009). Os valores de DP e CV% obtidos neste trabalho para o gene *GAPDH* estudado foram iguais a 1,29 e 118,22, respectivamente, valores relativamente altos e que indicam a instabilidade deste gene para estas condições experimentais específicas em arroz.

Assim como o gene *GAPDH,* o gene *Eef1-α* apresentou padrão de expressão variado, com valores de DP e CV% de 1,23 e 123,90, respectivamente, além de valores de M=0,947; 1,095 e 0,760 nos algoritimos geNorm, NormFinder e BestKeeper, diferentemente dos resultados obtitos por por Jain *et al*. (2006), os quais indicaram o gene *Eef-1α* como um dos mais estáveis em amostras de tecidos de arroz em diferentes condições experimentais.

As ciclofilinas são proteínas ligadas à função de modulação da permeabilidade das membranas das mitocôndrias. As aquaporinas tipo Tip41 são importantes proteínas de transporte ligadas a manutenção do metabolismo celular. Os fatores de iniciação de eucariotos do tipo 4*α* são proteínas continuamente produzidas nas células e extremamente conservadas no genoma eucarioto. Estas três famílias de proteínas correspondem aos genes *Cyclophilin*, *TIP41-Like* e *eIF-4α,* também testados neste trabalho.

Para estes genes, foram observados os maiores valores de DP, CV% e estabilidade média de expressão (M), os quais não são indicados como normalizadores para as condições experimentais testadas. De maneira extremamente oposta, Caldana *et al*. (2007) obtiveram padrões de expressão estáveis para esses três genes, os quais foram recomendados por estes autores como bons normalizadores para plantas de arroz submetidas a 100 mM de NaCl.

A contradição destes e outros resultados, corroboram a importância de uma escolha correta do gene constitutivo para análises de expressão de transcritos por qRT-PCR. Interpretações errôneas e inconsistentes podem ser levadas adiante se uma validação prévia de genes de referência não for realizada para as condições experimentais do estudo.

Conclusões

A análise da estabilidade de expressão de dez genes candidatos a normalizadores para estudos de qRT-PCR, sugere o gene constitutivo *UBQ10* o mais adequado para estudos em folhas de arroz dos genótipos, BRS Bojuru (tolerante) e BRS Ligeirinho (sensível), submetidos ao estresse salino, uma vez que este apresentou um padrão de expressão contínuo e consistente. Por outro lado, os genes *eIF-4α*, *Cyclophilin* e *TIP41-Like* são os menos indicados para as condições experimentais testadas. O presente trabalho também reforça a importância da avaliação e validação prévia de genes normalizadores nas condições experimentais de cada estudo em particular.

Bibliografia

Almeida, Marcia Rodrigues (2009) Análise de genes de para estudos de expressão gênica em *Eucalyptus* Labill durante o processo de enraizamento adventício através da técnica de PCR quantitativo em Tempo Real. Monografia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Andersen CL, Jensen JL and Orntoft TF (2004) 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 Res 64:5245-5250.

Bastolla, Fernanda (2007) Seleção e avaliação de genes de referência para estudos de expressão gênica em *Eucalyptus*. Dissertação de mestrado. Algoritimo de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Brunner AM, Yakovlev IA and Strauss SH (2004) Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. BMC Plant Biol 4:14.

Caldana C, Scheible W-R, Roeber BM and Ruzicic S (2007) A quantitative RT-PCR platform for higt-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. Plant Methods 3:7

Carmona, FC (2011) Salinidade da água e do solo e sua influência sobre o arroz irrigado. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Chao WS, Dogramaci M, Foley ME, Horvath DP and Anderson JV (2012) Selection and validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis in Leafy Spurge (*Euphorbia esula*). PLoS ONE 7:1-10.

Chen L, Zhong HY, Kuang JF, Li JG, Lu WJ and Chen JY (2011) Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. Planta 234:377-390.

Chen D, Pan X, Xiao P, Farwell MA and Zhang B (2011) Evaluation and identification of reliable reference genes for pharmacogenomics, toxicogenomics, and small RNA expression analysis. J Cell Physiol 226:2469-2477.

Cotsaftis O, Plett D, Johnson AAT, Walia H, Wilson T, Ismail AM, Close TJ and Baumann U (2011) Root-specific transcript profiling of contrasting rice genotypes in response to salinity stress. Mol. Plant 4:25-41.

Czechowski T, Stitt M, Altman T, Udvardi MK and Scheible WR (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. Plant Physiol 139:5-17.

Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A and Pérez JA (2008) Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. BMC Plant Biol 8:131.

Gachon C, Mingan A and Charrier B (2004) Real time PCR: what relevance to plant studies? J Exp Bot 55:1445-1454.

Guénin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C and Gutierrez L (2009) Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. J Exp Bot 60:487-493.

Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, Pelloux J, Lefebvre JF, Louvet R, Rusterucci C, Moritz T, Guerineau F, Bellini C and Van Wuytswinkel O (2008) The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. Plant Biotechnol J 6:609-618.

Hernandez-Garcia CM, Martinelli AP, Bouchard RA and Finer JJ (2009) A soybean (*Glycine max*) polyubiquitin promoter gives strong constitutive espression in transgenic soybean. Plant Cell Pep 28:837-849.

Hoagland DR and Arnon DI (1938) The water culture method for growing plants without soil.

2nd edition. California Agricultural Experiment Station, Davis, 32pp.

Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK and Khurana JP (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. Biochem Biophys Res Commun 345:646-651.

Ludwig SR, Oppenheimer DG, Silflow CD and Snustad DP (1987) Characterization of the a-tubulin gene family of *Arabidopsis thaliana.* Proc Natl Acad Sci USA 84:5833-5837.

Muñoz-Bertomeu J, Cascales-Miñana B, Mulet JM, Baroja-Fernández E, Pozueta-Romero J, Kuhn JM, Segura J, and Ros R (2009) Plastidial Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Leads to Altered Root Development and Affects the Sugar and Amino Acid Balance in *Arabidopsis.* Plant Physiol 151:541-558.

Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L and Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. J Exp Bot 56:2907-2914.

Panda SK and Khan MH (2009) Growth, Oxidative Damage and Antioxidant Responses in Greengram (*Vigna radiata* L.) under Short-term Salinity Stress and its Recovery. J Agronomy & Crop Science 195:442-454.

Pfaffl MW, Horgan GW and Dempfle L (2002) Relative expression algoritimo tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res 30:1-10.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C and Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnol Lett 26:509-515.

Rasmussen RP (2001) Quantification on the Light Cycler. In: Meuer S, Wittwer CT and Nakagawara K (eds) Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications. 1st edition. Springer Press, Heidelberg, pp 21-34.

Silver N, Best S, Jiang J and Thein SL (2006) Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. BMC Mol Biol 7:33-42.

Sun CW, Griffen S and Callis J (1997) A model for the evolution of polyubiquitin genes from the study of *Arabidopsis thaliana* ecotypes. Plant Mol Biol 34:745-758.

Tester M and Devenport R (2003) Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. Ann Bot 91:503-527.

Tong Z, Gao Z, Wang F, Zhou J and Zhang Z (2009) Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using realtime PCR. BMC Mol Biol 10:71.

Tu L, Zhang X, Liu D, Jin S, Cao J, Zhu L, Deng F, Tan J, and Zhang C (2007) Suitable internal control genes for qRTPCR normalization in cotton fiber development and somatic embryogenesis. Chin Sci Bull 52:3110-3117.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A and Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 3:1-12.

Walia H, Wilson C, Condamine P, Liu X, Ismail AM, Zeng L, Wanamaker S, Mandal J, Xu J, Cui X and Close (2005) Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during vegetative growth stage. Plant Physiol 139:822-835.

Whittaker DJ and Triplett BA (1999) Gene-Specific Changes in a-Tubulin Transcript Accumulation in Developing Cotton Fibers. Plant Physiol 121:181-188.

Zhang Z and Hu J (2009) Development and validation of endogenous reference genes for expression profiling of Medaka (*Oryzias latipes*) exposed to endocrine disrupting chemicals by quantitative real-time RT-PCR. Toxicol Sci 95:356-368.

Internet Resources

FAO (2008). Extent and Causes Salt-affected Soils in Participating Countries. Rome, Italy: FAO Land and Plant Nutrition Management Service. http://www.fao.org/nr/aboutnr/nrl/en/#top. (July 1, 2013).

Cotton EST database, http://www.leonxie.com/ (July 1, 2013).

PLANT MOLECULAR BIOLOGY

(ISSN: 0167-4412/ ISSN: 1573-5028)

EXPRESSÃO DE GENES *LTP$_S$1* EM RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO EM PLÂNTULAS DE ARROZ

Resumo

O estresse salino é um dos principais fatores que limita o aumento da produtividade de arroz (*Oryza sativa* L.) na região Sul, já que as lavouras de arroz desta região podem ser afetadas pela salinidade, devido tanto à gênese dos solos, quanto à deposição de sais pela água da irrigação, especialmente da Laguna dos Patos. As proteínas LTPs ("Lipid Transfer Proteins") são pequenas proteínas de até 10 kDa com múltiplas funções fisiológicas incluindo o envolvimento com estresse salino, na transferência de lipídios e nas alterações da composição lipídica da membrana. Assim, o objetivo deste trabalho foi quantificar a expressão relativa de 11 isoformas gênicas (*LTP7*, *LTP8*, *LTP10*, *LTP12*, *LTP13*, *LTP14*, *LTP17*, *LTP18*, *LTP23*, *LTP25*, *LTP26*) que codificam proteínas do tipo *LTP1*, com a finalidade de identificar marcadores moleculares para serem utilizados na seleção assistida de genótipos tolerantes ou sensíveis ao estresse salino. Sementes das cultivares BRS Bojuru (tolerante) e BRS Ligeirinho (sensível) foram cultivadas em casa de vegetação. Quando as plantas atingiram o estádio V_4, a irrigação passou a ser realizada, alternadamente, com solução nutritiva e água contendo 150 mM de NaCl. A coleta das folhas para as análises foi realizada durante cinco dias, com intervalos de 24 horas. Para as análises de qRT-PCR foram utilizados o sistema de detecção SYBR Green Master Mix e primers para os genes alvo e normalizador interno da reação (*UBQ10*-AK101547). Todas as reações foram realizadas com três repetições técnicas e

biológicas e o cálculo de quantificação relativa (QR) foi feito utilizando o método 2-ΔΔCT. A partir dos resultados obtidos verificou-se que, o gene *LTP7* apresentou aumento nos níveis de mRNA em ambos os genótipos, porém em BRS Bojuru esse aumento foi de 13,81 vezes nas 96 horas de estresse em relação ao controle (0 mM de NaCl). Para *LTP8*, não houve diferença nos níveis de expressão na cultivar tolerante, enquanto que para BRS Ligeirinho a maior média de QR (3,39), foi observada após 96 horas de estresse. O gene *LTP10* apresentou amento de expressão com 48 horas (3,67) caindo nos demais tempos para BRS Bojuru, enquanto que para BRS Ligeirinho o aumento foi constante chegando a 71,10 vezes no tempo de 96 horas. Os genes *LTP26*, *LTP23* e *LTP18* apresentaram aumento de expressão tanto no genótipo sensível quanto no tolerante, porém com níveis de expressão e tempos de resposta diferenciados entre os genótipos. Assim, conclui-se que, *LTP7* e *LTP10* são os genes mais responsivos à salinidade, podendo, o primeiro ser utilizado como marcador para seleção de genótipos tolerantes, e o segundo para a identificação de genótipos sensíveis à salinidade. Os genes *LTP10*, *23* e *26* podem ser utilizados como marcadores para a seleção assistida de plantas de arroz para o estresse salino por apresentarem resposta de expressão contrastante entre os genótipos e se correlacionarem de maneira negativa.

Palavras-chave: Estresse Abiótico, *Oryza sativa* L., *UBQ10*

Introdução

Considerado um dos cereais mais importantes do mundo, o arroz (*Oryza sativa* L.) é cultivado e consumido em todos os continentes, ocupando posição de destaque do ponto de vista social e econômico. O principal produtor mundial de arroz é a China, com uma produção média de 197,2 milhões de toneladas. O Brasil aparece em 9° lugar, produzindo 11,3 milhões de toneladas ao ano (FAO 2012).

Apesar dos bons níveis de produtividade citados, observa-se uma variação acentuada ao longo dos anos, causada, fundamentalmente, pelas condições climáticas. O estresse salino é um dos principais fatores abióticos que causam perdas acentuadas na produtividade das culturas e no território de terra arável, contribuindo, portanto, para a desertificação nas zonas áridas e semi-áridas (Pons et al. 2011). Na cultura do arroz, a salinização do solo e da água de irrigação, durante as fases de estabelecimento e, principalmente, na fase reprodutiva, é um dos elementos climáticos que está intimamente relacionado com a variabilidade nos níveis de produtividade.

Dentre os principais danos causados pelo estresse salino inclui-se: redução do potencial osmótico do solo, restringindo assim a disponibilidade da água e a absorção de nutrientes; toxicidade metabólica, inibição da fotossíntese, redução da assimilação de CO_2, redução no crescimento e desenvolvimento; acúmulo de íons em excesso nos tecidos vegetais, podendo ocasionar toxicidade iônica; diminuição nas taxas de fotorrespiração, fotossíntese e respiração mitocondrial; aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS); mudanças nas concentrações de carboidratos solúveis totais, fenóis totais, glicina beitaína, prolina, clorofila e proteínas. Ao nível celular, a salinidade causa distúrbios na membrana plasmática, sendo seus efeitos manifestados por alterações na permeabilidade, na composição lipídica, potencial elétrico e atividade de enzimas e proteínas ligadas à membrana (Mansour et al. 2003; Mittler 2002; Panda e Khan 2009).

As proteínas *LTPs* (“Lipid Transfer Proteins”) compõem uma família também descrita como “Alpha-Amylase Inhibitors” (AAI), “Lipid Transfer” (LT) e “Seed Storage” (SS), sendo pequenas proteínas de até 10 kDa presentes de forma abundante em plantas superiores. Bioquimicamente, as proteínas *LTPs* são subdivididas em duas famílias distintas (*LTPs*1 e *LTPs*2), que compartilham a capacidade de ligar-se a ácidos graxo e transferir fosfolipídios entre membranas. Embora ambas as famílias se caracterizam por apresentar um elevado pI (~9) e um motivo consevado constituído por oito resíduos de cisteína (C. .. C. .. CC ... CXC ... C. .. C), as *LTPs* 1 e 2, diferem no peso molecular (9 kDa e 7 kDa, respectivamente) e apresentam baixa similaridade (~ 30% de identidade) entre suas sequências de aminoácido geral. As duas famílias também partilham uma arquitetura estrutural comum, formada por uma cavidade hidrofóbica fechada por α-hélice (Yeats and Rose 2007).

Inicialmente, as pesquisas sugeriam que as *LTPs* estavam relacionadas apenas com a transferência e ligação de ácidos graxos e fosfolipídios entre as membranas, no entanto, atualmente sabe-se que estas proteínas também estão envolvidas na modificação da composição lipídica e biogênese de membrana (Wu et al. 2004, Kirubakaran et al. 2008). Além disso, as *LTPs* apresentam atividade antifúngica e desempenham papel vital em respostas de defesa da planta a ataques de patógenos (Gomes et al. 2003).

Uma função importante que tem sido atribuída às *LTPs* inclui o seu envolvimento em diferentes estresses abióticos (Jang et al. 2002). Genes que codificam proteínas *LTPs* foram diferencialmente regulados por várias condições ambientais, tais como temperatura elevada (Oshino et al. 2007), estresse por frio (Hwang et al. 2005), estresse salino (Vignols et al. 1997; Liu e Lin 2003; Wu et al. 2004; Gonorazky et al. 2005, Choi et al. 2008) e estresse por metais pesados (Hollenbach et al. 1997). Tratamentos com Ácido abscísico (ABA) também podem induzir a expressão diferenciada dos genes *LTPs* (Yubero-Serrano et al. 2003; Federico et al. 2005).

Um grande número de pesquisas tem buscado fornecer maiores informações a respeito do papel fisiológico das proteínas *LTPs* (Carvalho e Gomes 2007); identificar isoformas gênicas através de alinhamentos em banco de dados; análises filogenéticas entre diferentes espécies (Boutrot et al. 2008; Wang et al. 2012) e descrever a estrutura destas proteínas (Pacios et al. 2012). No entanto, estudos na área de genômica funcional, referentes à expressão diferencial destes genes com técnicas pontuais de expressão como qRT-PCR (PCR quantitativa em tempo real), podem auxiliar na identificação de genes potencialmente responsivos aos diversos estresses bióticos e abióticos, dentre eles o estresse salino, fornecendo informações relacionadas aos mecanismos adaptativos a esta condição ambiental.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão diferencial de11 genes codificadores de proteínas da família *LTPs*1, nas cultivares de arroz, BRS Bojuru e BRS Ligeirinho, submetidas ao estresse salino no período vegetativo.

Material e Métodos

Material Vegetal e Condições Experimentais

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) dos genótipos BRS Bojuru (tolerante ao sal) e BRS Ligeirinho (sensível ao sal) foram desinfestadas com hipoclorito 1%, colocadas para germinar sobre papel *Germitest* em caixas *Gerbox*, e mantidas em câmara de crescimento do tipo "Biological Organism Development" (BOD) com fotoperíodo de 12h a 25±2°C, durante 10 dias. Após este período as plântulas foram transferidas para potes plásticos (500 mL) contendo como substrato areia previamente lavada com solução de ácido clorídrico 1%, e irrigadas, alternadamente a cada dois dias, com água e solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1938), em casa de vegetação.

Ao atingirem o estádio de desenvolvimento V_4, as plantas foram submetidas à irrigação alternada, com solução nutritiva e água contendo NaCl na concentração de 150 mM

(100 mL/pote). A concentração de NaCl utilizada foi escolhida com base em dados depositados na literatura para experimentos com estresse salino em arroz (Hong et al. 2007).

A coleta das folhas para as análises foi realizada durante cinco dias com intervalos de 24 horas e denominadas, C1, C2, C3, C4 e C5, onde: C1= plantas não expostas ao estresse (controle); C2=24 horas de estresse; C3=48 horas de estresse; C4=72 horas de estresse; C5=96 horas de estresse. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 2 x 5 (2 genótipos x 5 tempos de exposição ao sal) e três repetições biológicas, sendo cada repetição composta por 3 potes contendo 5 plantas.

Extração de RNA Total e Síntese de cDNA

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de folhas, de acordo com o método descrito para o reagente *Plant RNA Reagent Purilink*®. A quantidade e pureza de RNA foram mensuradas em NanoDrop ND-1000, enquanto que a qualidade e integridade do RNA foram verificadas em eletroforese com gel de agarose 1,0%. Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa a partir de 2 µg de RNA total utilizando *primer* oligoDT e *Kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen®-18080093).

Identificação *in silico* de genes *LTPs1* de arroz

Para a busca de possíveis genes *LTPs*, foram utilizadas as informações contidas no banco de dados de famílias gênicas Phytozome v.9.1 (http://www.phytozome.net), sendo selecionadas apenas as sequências de proteínas anotadas com o domínio HMMPfam PF00234 (*plant lipid transfer/seed storage/trypsin–alpha amylase inhibitor*). Poteriormente, utilizando a informação do *Locus name* , buscou-se, através da ferramenta *ID Converter* disponível no banco de dados de arroz RAP-DB (http://rapdb.dna.affrc.go.jp/tools/converter), o número de ID (OsXg....) e a sequência de aminoácidos codificada por cada uma das possíveis sequências de

genes *LTPs* e a evidência de transcrito (AK).

As sequências de aminoácidos foram então alinhadas no banco de domínios conservados de proteínas CDD (*Conserved Domains and Protein Classification*) depositados em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml, a fim de verificar se as sequências continham o motivo conservado de 8 resíduos de cisteína (C. .. C. .. CC ... CXC ... C. .. C). Foram considerados significativos os alinhamentos com valor estatístico de *e-value* $\leq e^{-10}$ e código de identificação [cd01960], característico de proteínas *LTPs*1.

Desenho de *Primers*

A partir das sequências nucleotídicas retiradas dos AKs, os *primers* foram desenhados com o auxílio dos softwares PRIMER EXPRESS V 3.0, BioEdit v7.0 e PerlPrimer v1.1.21, de acordo com os tutoriais dos fabricantes. Como norma geral foram selecionados *primers* com temperatura de anelamento entre 58-60º C, tamanho de *amplicon* entre 50 e 150 pb e ausência de formação de dímeros, cross-dímeros e *harpins*. Vale salientar, que anteriormente ao desenho dos *primers* foram realizados alinhamentos entre as possíveis isoformas das *LTPs* selecionadas, para garantir a especificidade de cada conjunto de *primer*.

Teste de eficiência e curva de dissociação dos *primers*

A especificidade e curva padrão de eficiência dos *primers* foram avaliadas a partir de um *pool* de 15 cDNAs (5 tempos x 3 repetições) para cada genótipo. Inicialmente, foi verificada, através da curva de dissociação (*curva de melting*), a especificidade de cada conjunto de *primer*, sendo mantidos neste estudo somente aqueles *primers* com *amplicons* específicos, ou seja, com um único pico de dissociação das fitas dos produtos da PCR.

A eficiência da PCR (E) 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 $E = 10^{(-1/slope)}$ (Rasmussen 2001), onde o *slope* corresponde à inclinação da reta obtida da regressão entre os valores de C_T (*Cycle Threshold*) dos transcritos e os valores do logaritmo das diferentes diluições de cDNA (curva padrão de eficiência), sendo considerados aceitáveis valores de eficiência entre 1,8 e 2,2, o que corresponde a uma eficiência da reação entre 90-110%. As reações foram feitas em triplicata para cada diluição de cDNA.

Quantificação relativa (qRT-PCR)

O volume total das reações de qRT-PCR foi de 12 µL, sendo 6,25 µL do fluoróforo SYBR Green (Applied Biosystems®), 0,25 µL (10 mM) de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 1 µL de cDNA (diluição 1:25, previamente definida) e 4,25 µL de água ultra pura. As reações foram realizadas em Termociclador Bio-Rad CFX Real Time, utilizando-se os seguintes parâmetros de amplificação: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto com inserção da curva de *melting* de 65 a 95°C, com incremento de 5°C a cada medida de fluorescência. Para cada repetição biológica foram feitas três repetições técnicas (triplicatas).

A quantificação relativa da expressão (QR) foi feita utilizando o "método de comparação de C_T" (*comparative threshold cycle method*) (Livack e Schmittgen 2001), utilizando-se a equação $QR = 2^{-\Delta\Delta CT}$. A partir dos valores de QRs, optou-se pela utilização da análise de variância (*proc glm*) para testar possíveis variações para os fatores, tempos de exposição ao sal e genótipo, de maneira isolada, bem como a interação entre ambos, sendo considerados significativos valores de $P \leq 0,05$. As análises foram realizadas no *SAS Algoritimo* v.9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Como normalizador interno da reação foi escolhido o gene *UBQ10* (AK101547), previamente selecionado entre outros 10 candidatos a normalizadores (*ACT11*, *UBC-E2*,

Fator alongamento eucariótico 1-α, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, β-Tubulina, Fator de iniciação eucariótica 4a, Ubiquitina5, Aquaporina TIP41 e Ciclofilina), nas amostras experimentais utilizadas neste trabalho.

Análise de Correlação

Com a finalidade de mensurar a intensidade de correlação da expressão de cada gene *LTP* entre os dois genótipos avaliados, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson, representada graficamente por um *heatmap* (mapa de cores). As análises foram realizadas no software SAS v.9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC), através das rotinas *proc corr* e *proc sgrender*.

Análises de Filogenia

As relações filogenéticas das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos dos genes e proteínas *LTPs*, identificadas *in silico*, foram analisadas em separado utilizando o software Mega versão 4. Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos foram realizados utilizando o programa ClustalW incluído no Mega. As estimativas das distâncias foram calculadas utilizando o método de substituição Kimura-2 parâmetros (Kimura 1980), que calcula as diferenças entre duas sequências com diferentes taxas para transição e transversão entre nucleotídeos, sendo as concordâncias calculadas através de 1000 *bootstrap*. A árvore filogenética foi construída utilizando o método de agrupamento UPGMA.

As sequências de aminoácidos foram alinhadas pelo ClustalW, seguindo os parâmetros padrão do programa com matriz de substituição PAM (Eck e Dayhoff 1966). Posteriormente, a análise filogenética foi feita utilizando o modelo cladístico da máxima parsimonia (Fitch 1971), o qual cria inúmeros alinhamentos e que seleciona como melhor cladograma aquele que contenha o menor número de diferenças entre as sequências. A árvore filogenética foi

avaliada, também, pelo *bootstrap* usando 1000 réplicas.

Similaridade e *Heatmap*

Com base nos valores de quantificação relativa (QR) foram feitas análises de similaridade e agrupamento, a fim de agrupar os genes *LTPs* com respostas de expressão mais semelhantes. A similaridade foi estimada através da Distância Euclidiana (rotina *proc distance*), enquanto que para o agrupamento foi utilizado o método UPGMA (*proc cluster*), sendo o dendrograma obtido pela rotina *proc tree*, no software SAS v.9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Ainda com base nos valores de QR foi gerado um *heatmap*, a fim de facilitar a associação visual dos níveis de expressão gênica e relacionar esta resposta com as análises filogenéticas, com o objetivo de verificar se existe uma tendência de resposta entre os níveis de expressão e as sequências de nucleotídeos e/ou aminoácidos das *LTPs* estudadas. O *heatmap* foi gerado através da rotina *proc sgrender*, no software SAS v.9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Resultados

A partir da busca feita no banco de dados Phytozome, foram identificados 158 genes descritos como *LTPs*, no entanto, apenas 14 apresentavam o domínio HMMPfam PF00234 (*plant lipid transfer/seed storage/trypsin–alpha amylase inhibitor*), evidência de transcrito no banco de dados RAP-DB e alinhamento significativo (*e-value* $\leq e^{-10}$) com código de identificação [cd01960] no banco de domínios conservados de proteínas (*Conserved Domains and Protein Classification*) (Tabela 1), sendo, portanto, selecionadas para este estudo.

A especificidade da amplificação é determinada pela presença de um único pico na curva de dissociação (*Melting*). Nesta curva analisa-se a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, sendo que cada *amplicon* possui uma

temperatura de fusão específica, o que possibilita diferenciar os produtos resultantes da PCR. As curvas de dissociação apresentadas demonstram que, dos 14 *primers* desenhados, 11 possuem um pico único bastante definido, confirmando especificidade do produto amplificado. A eficiência de amplificação dos *primers* foi calculada individualmente a partir do Log das diluições de cDNA, para cada um dos genótipos. As análises demonstraram eficiências próximas a 100%, variando entre 1,5 e 2,16 (Figuras 1, 2 e 3).

Tabela 1. Especificações dos Genes *LTP*$_S$ com seus respectivos códigos de acesso e valores de e-value das LTP$_S$. Sequência Forward e Reverse dos primers desenhados a partir dos transcritos e eficiência média dos iniciadores.

Gene (Phytozome)	**Transcrito**	***e-value*** (CDD)	***Primer Forward***	***Primer Reverse***	**Eficiência**
LTP7	AK058896.1	$4{,}77e^{-16}$	5'-GGAGGGTGTGACATCGCAGG-3	5'-AAGCGTGAGACGACGACAGGT-3'	2,08
LTP8	AK061182.1	$1{,}56e^{-28}$	5'-CCTCTACTCCCTCTATCCCA-3'	5'-CGAACATAAGACTGGATGTGAC-3'	2,08
LTP10	AK061288.1	$1{,}30e^{-24}$	5'-ATTAACCAACACCGAGCATCA-3'	5'-CGATCGATCCAGAGGATGCTA-3'	2,09
LTP12	AK058921.1	$1{,}15e^{-14}$	5'-CCATCCATCATCCATCTCATCATC-3'	5'-GCTAGTACTGTTGATCTAGTTGCTG-3'	1,87
LTP13	CU406598.1	$1{,}55e^{-28}$	5'-CTTCTTGTTGCTGAGGCAATCTG-3'	5'-TTATGGGACGGAGGGAGTAGAG-3'	2,07
LTP14	AK059737.1	$1{,}02e^{-27}$	5'-TCTAGCTTAGCTACTCGATCATCAG-3'	5'-CAAGATTACTGATTTGATCGTCGGA-3'	2,03
LTP17	AK243196.1	$1{,}56e^{-14}$	5'-TGGAAGCAGCACTTTCGGC-3'	5'-TTATTCATTCACGGCCCACG-3'	1,85
LTP18	AK109524.1	$4{,}16e^{-23}$	5'-TACCCATCCTTGCAGCTCACG-3'	5'-CATCGTCTCCATCAGGGCCA-3'	2,16
LTP23	AK073466.1	$3{,}58e^{-29}$	5'-TTTGATCTGTCTCCTTTACGGGAC-3'	5'-AAGATTCATGCATGATTCGTCTGC-3'	1,95
LTP25	AK119692.1	$2{,}94e^{-22}$	5'-CTTGCTGCATGCGTACGT-3	5'-GTACGCATGTATCAGTACGAC-3'	1,98
LTP26	AK104005.1	$2{,}94e^{-22}$	5'-CATGCGTACGTGCACTATAT-3'	5'-CATGTAAACATTGAAACGCAT-3'	2,1

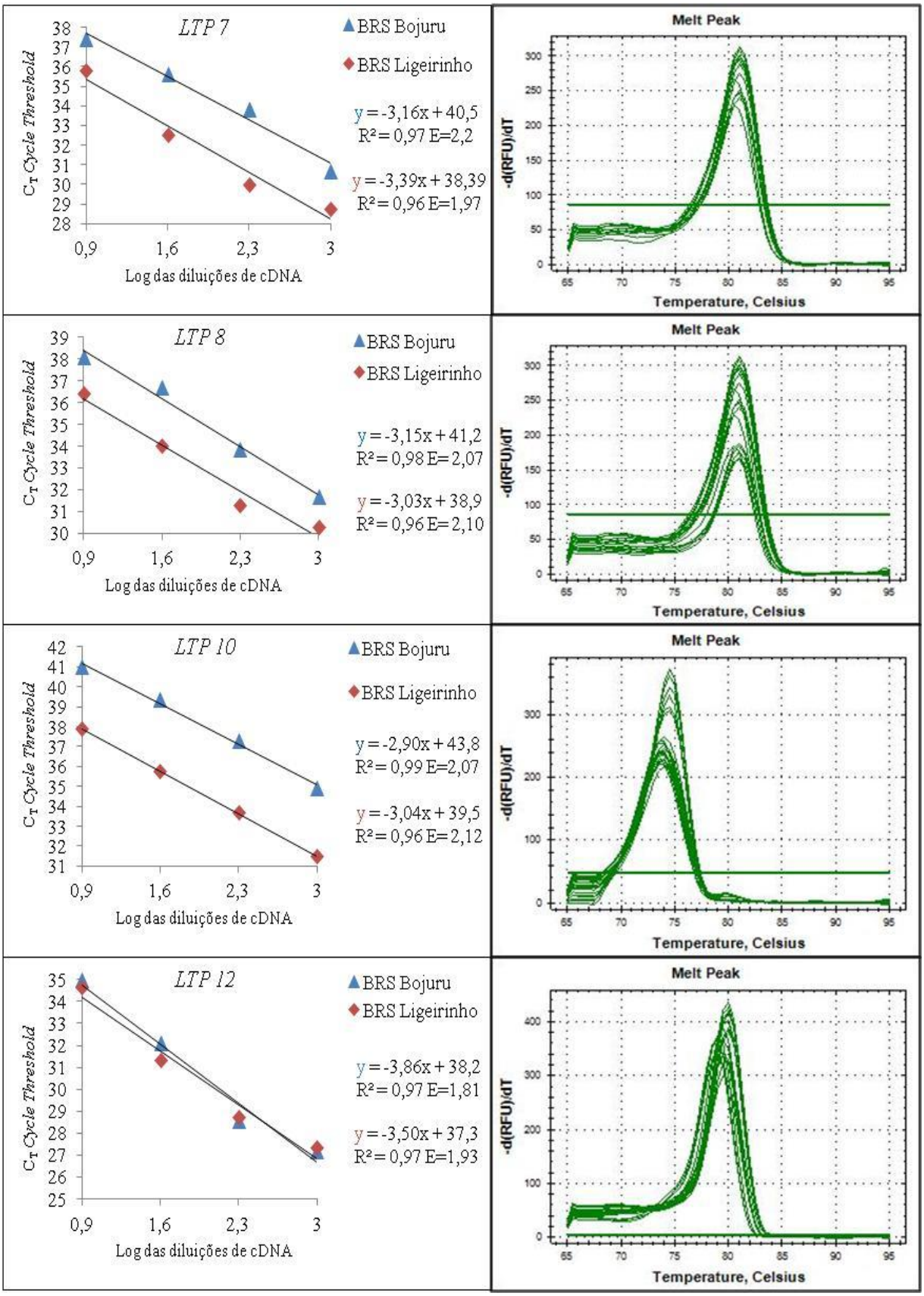

Figura 1. Especificidade e eficiência dos *primers* testados, para os genótipos BRS Bojuru (tolerante) e BRS Ligeirinho (sensível).

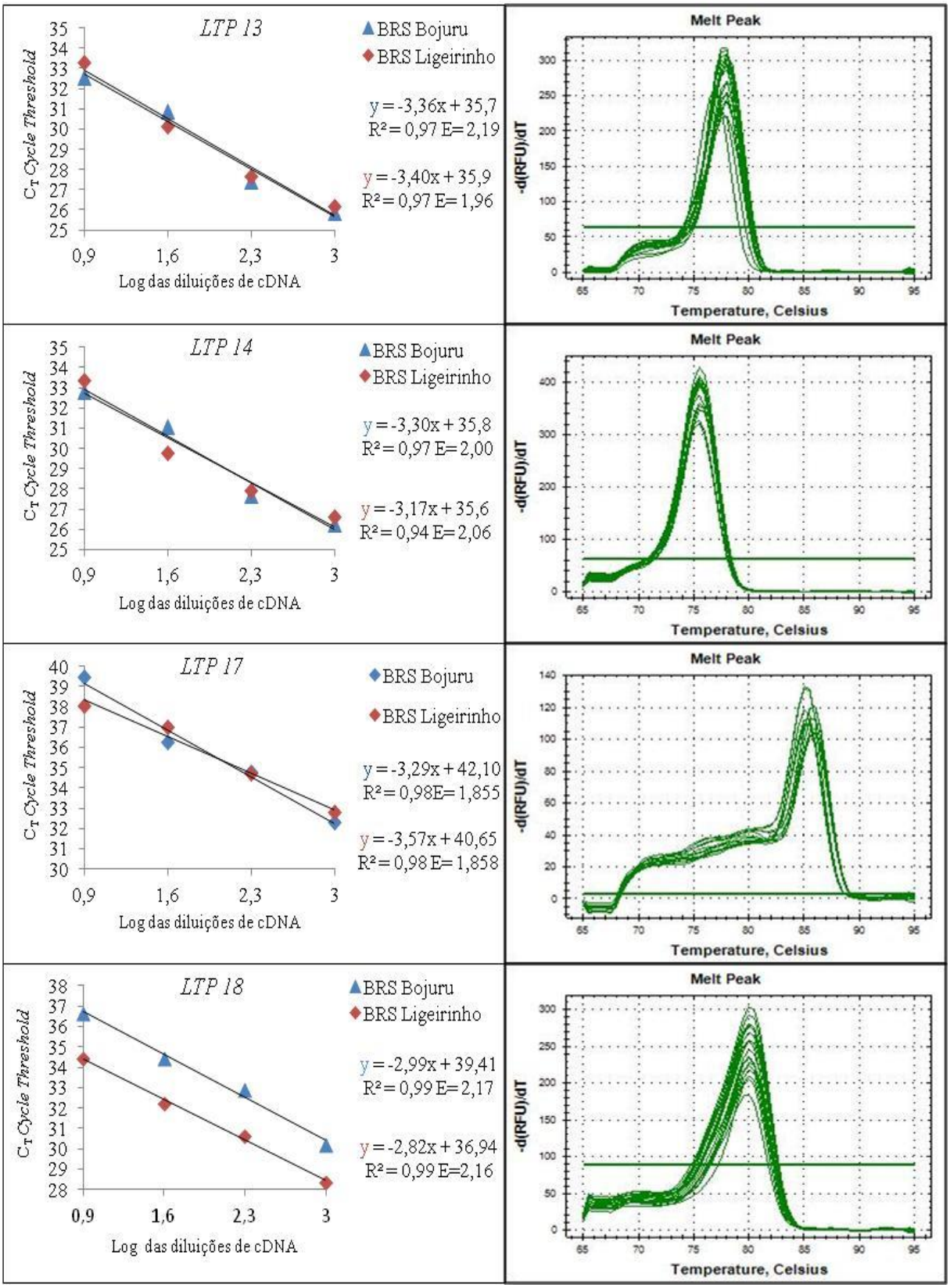

Figura 2. Especificidade e eficiência dos *primers* testados, para os genótipos BRS Bojuru (tolerante) e BRS Ligeirinho (sensível).

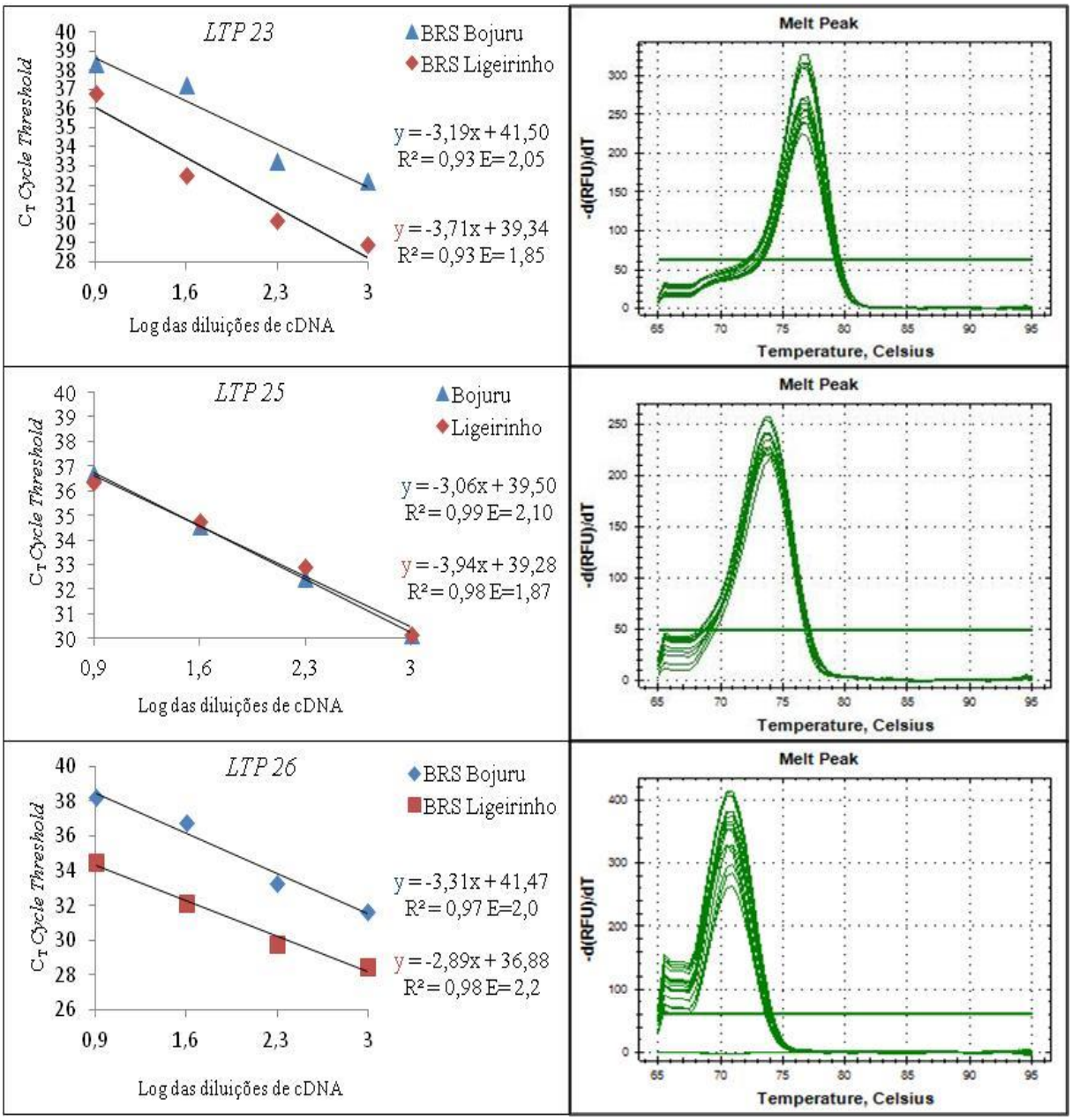

Figura 3. Especificidade e eficiência dos *primers* testados, para os genótipos BRS Bojuru (tolerante) e BRS Ligeirinho (sensível).

De acordo com os resultados da análise de variância, houve efeito significativo da interação para todos os genes avaliados, demonstrando que os mesmos apresentam variação nos valores de QR em função do tempo crescente de exposição ao estresse salino e do genótipo avaliado. Como forma de desdobrar os efeitos da interação efetuou-se a análise de regressão polinomial, sendo representados na forma de gráficos individuais para cada gene e

equações e coeficientes de determinação específicos para cada genótipo (Figuras 4,5 e 6).

Observou-se uma resposta linear positiva para QR do gene *LTP7* no genótipo BRS Ligeirinho e quadrática para BRS Bojuru. Ambos os genótipos apresentaram aumento nos níveis de expressão até o tempo de 96 horas de exposição ao estresse, porém, este aumento foi mais acentuado, 13,8 vezes em relação ao controle, em BRS Bojuru (Figura 4 A). O tempo de 96 horas apresentou os maiores valores de QR, 3,39 e 71,1, para *LTP8* e *LTP10*, respectivamente, no genótipo sensível, para os quais a curva de 3° grau foi a que melhor se ajustou aos dados obtidos. Nestes mesmos genes, as equações de regressão significativas, para BRS Bojuru, foram a linear e a cúbica, respectivamente (Figura 4 B e C).

Em relação aos genes LTP12 e LTP14, ajustou-se, para ambos os genótipos a equação cúbica, sendo observados, para o genótipo BRS Bojuru, os maiores valores de expressão destes genes no tempo de 72 horas (QR *LTP*12 = 2,28; QR *LTP*14 = 7,28). Para BRS Ligeirinho, o valor de QR do gene *LTP12* aumentou no tempo de 72 horas e se manteve às 96 horas, enquanto que para *LTP14*, houve aumento até 72 horas seguido de decréscimo após este período (Figura 5 D e E).

Analisando-se a regressão para os genes *LTP13* e *LTP17*, identificou-se, para o genótipo tolerante, uma resposta cúbica negativa para o primeiro gene e quadrática positiva para o segundo, sendo observados para *LTP13*, valores de expressão inferiores ao tratamento controle nos tempos de 72 e 96 horas de estresse. Para BRS Ligeirinho foram ajustadas equações cúbica e quadrática para *LTP13* e *LTP17*, respectivamente, sendo, no entanto, ambas positivas (Figura 5 F e G).

Os genes *LTP25* e *LTP26* apresentaram resposta de expressão significativa apenas por uma curva de regressão de 4°grau, no genótipo BRS Ligeirinho. Foram observados aumentos significativos no tempo de 96 horas, 23,28 e 32,18 vezes em relação às plantas não submetidas ao estresse salino, respectivamente. Para BRS Bojuru, para estes mesmos genes,

utilizou-se a regressão quadrática, indicando aumento nos níveis de transcritos seguido de decréscimo, sendo o maior valor de QR (24,44) observado no tempo de 48 horas para *LTP26* (Figura 6 I e L).

Quanto ao gene *LTP18*, observou-se, pela análise de regressão, uma resposta significativa através de uma curva de 4° grau para o genótipo BRS Bojuru, sendo observado aumento nos tempos de 48 e 72 horas seguido de acentuada redução no tempo de 96 horas. Vale salientar que o valor de QR observado no tempo de 72 horas (QR = 41,57) foi o mais elevado entre todos os genes *LTPs* analisados neste estudo para o genótipo tolerante. Para BRS Ligeirinho, observou-se uma resposta linear positiva para *LTP18*, com aumento constante nos níveis de QR ao longo do tempo de exposição ao estresse, chegando ao valor de 24,38 vezes mais expressão deste gene quando comparado ao tempo controle (Figura 6H).

Considerando os valores de QR para o gene LTP23, observou-se uma resposta quadrática positiva, em relação aos tempos crescentes de exposição ao NaCl, no genótipo BRS Ligeirinho, sendo o maior valor de QR (48,18) encontrado no tempo máximo de exposição ao estresse (96 h). Para BRS Bojuru, ajustou-se uma equação cúbica negativa, sendo observado aumento nos níveis de QR até o tempo de 72 horas, com redução no tempo de 96 horas (Figura 6J).

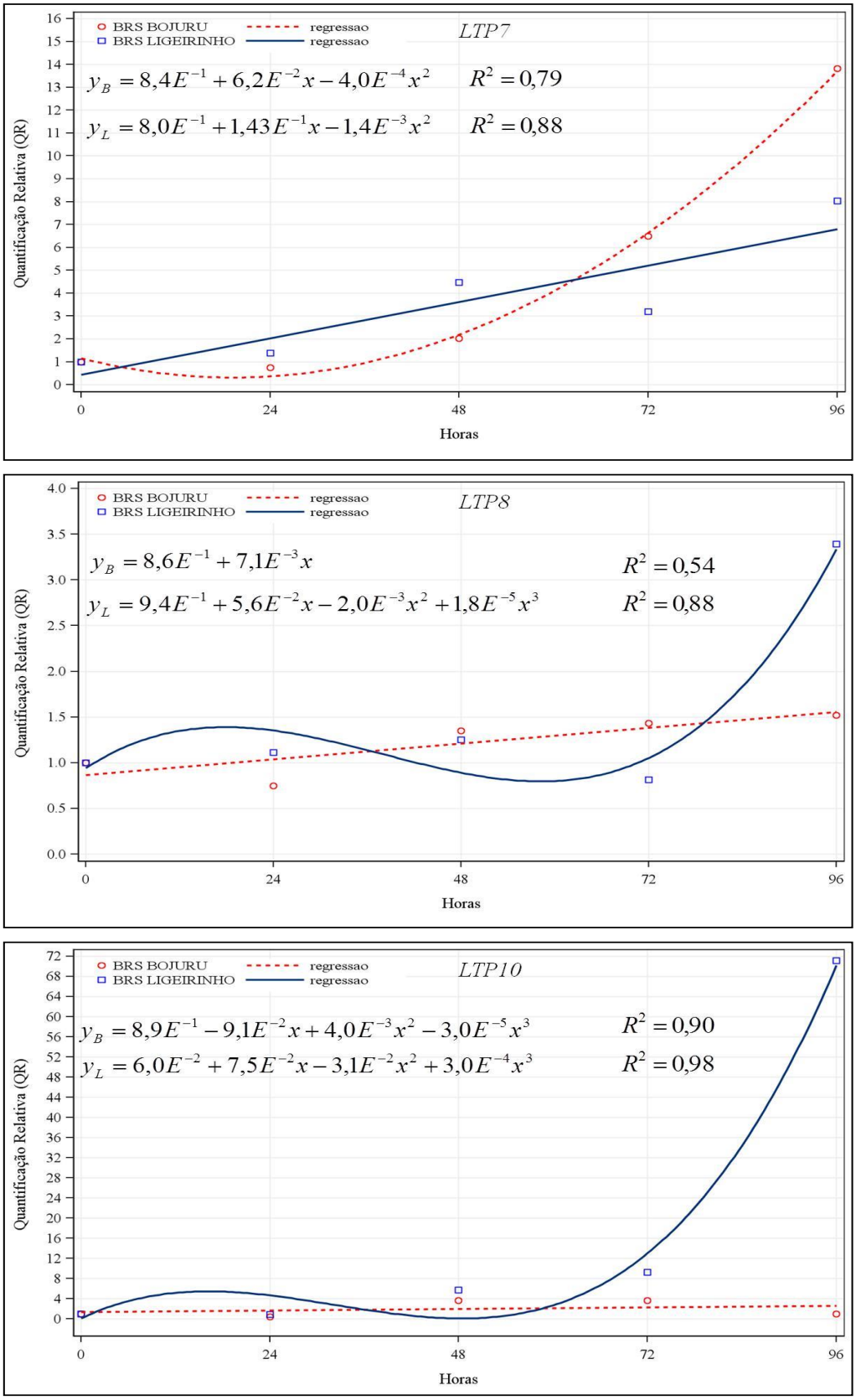

Figura 4. Quantificação relativa da expressão (QR) de genes *LTPs*, em genótipos de arroz submetidos ao estresse salino.

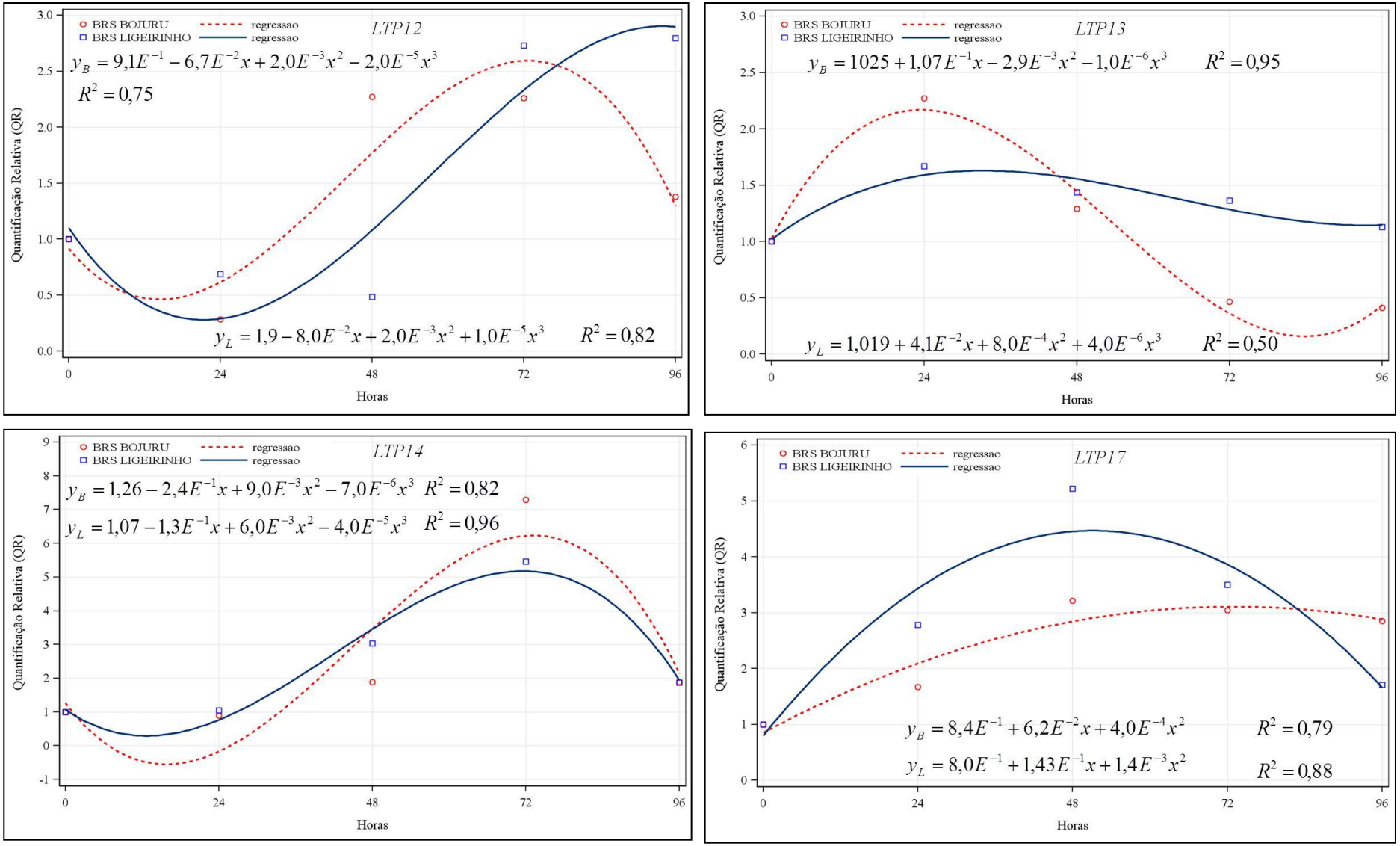

Figura 5. Quantificação relativa da expressão (QR) de genes *LTPs*, em genótipos de arroz submetidos ao estresse salino.

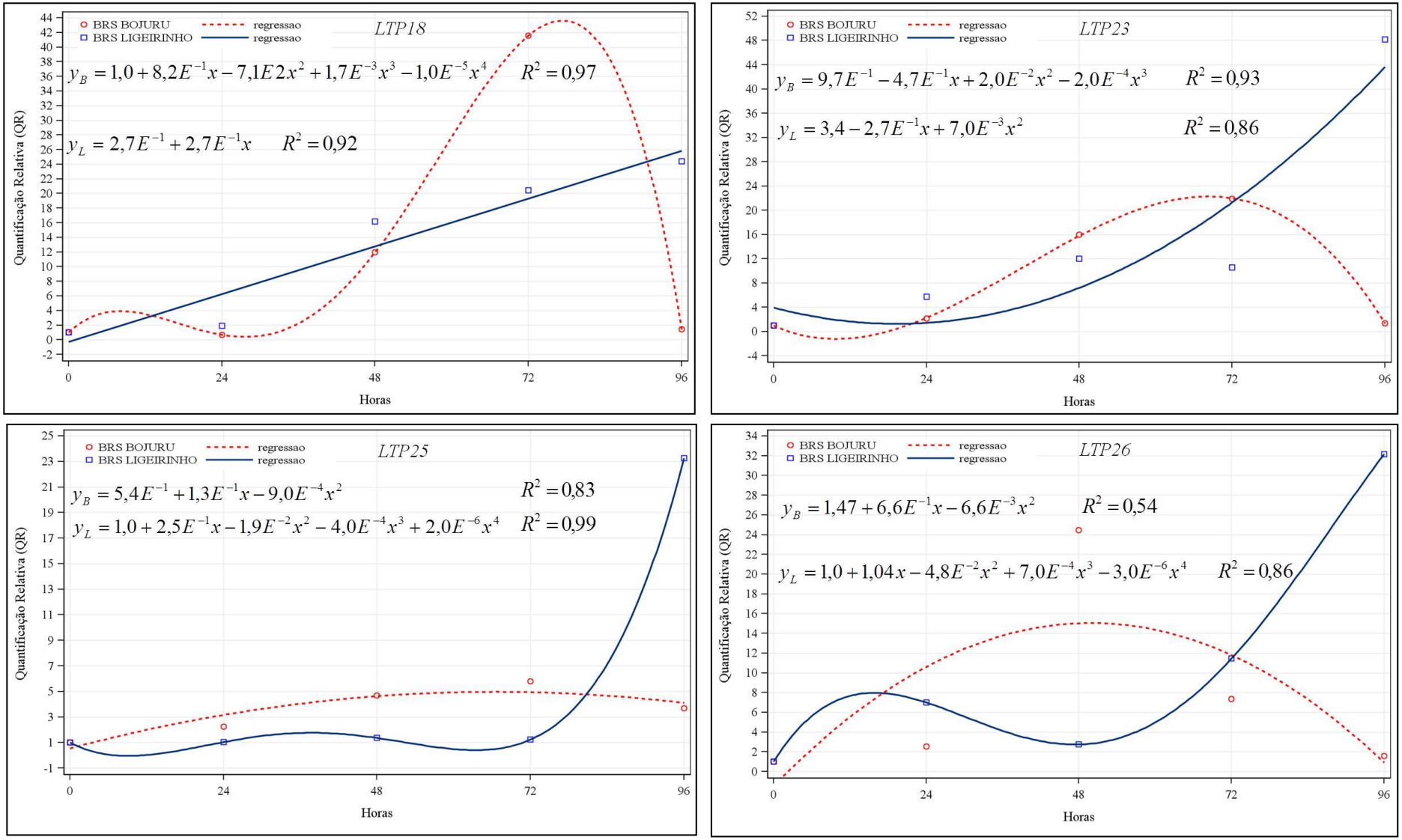

Figura 6. Quantificação relativa da expressão (QR) de genes *LTPs*, em genótipos de arroz submetidos ao estresse salino.

A avaliação da correlação de Pearson, para todas as sequências *LTPs*, entre os genótipos, possibilitou a identificação de sete sequências com correlação positiva, sendo elas: *LTP7* e *LTP14*, seguidas de *LTP13* e *LTP17*, *LTP8*, *LTP18* e *LTP12*, sendo, portanto, as *LTPs* com resposta mais semelhante entre os dois genótipos (sensível e tolerante). Por outro lado, as *LTPs* 10, 26 e 23, apresentaram-se correlacionadas de maneira negativa, indicando resposta contrastante na expressão destes genes entre os genótipos, surgindo como possíveis marcadores para a seleção assistida para o estresse salino em plantas de arroz. Analisando-se as correlações para as demais sequências, observou-se que, para *LTP25*, não houve correlação nos níveis de expressão entre os genótipos (Figura 7).

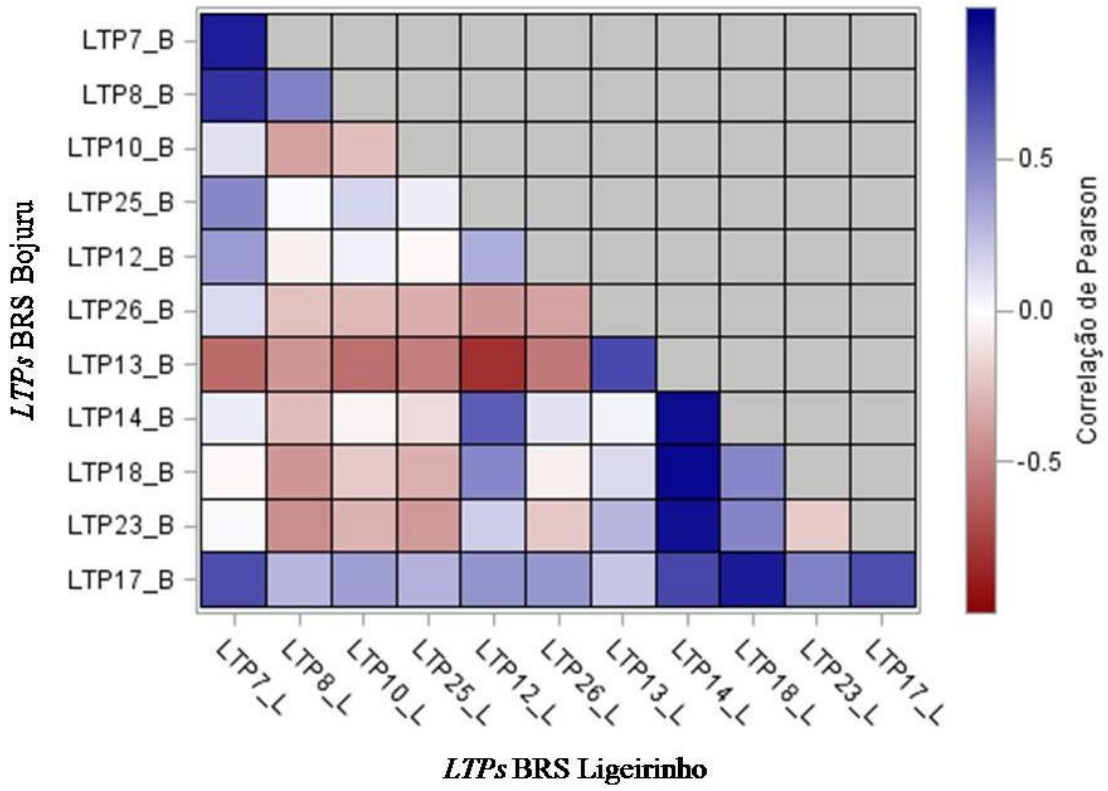

Figura 7. Correlação da expressão relativa de genes *LTPs*, representada graficamente por *heatmap*, entre genótipos de arroz contrastantes em resposta ao estresse salino. BRS Bojuru (tolerante) e BRS Ligeirinho (sensível).

A fim de comparar as sequências de nucleotídeos, aminoácidos e quantificação relativa de cada LTP, foram construídas árvores filogenéticas para nucleotídeos e aminoácidos, e matriz de similaridade seguida de agrupamento UPGMA baseada nos valores de QR.

As árvores filogenéticas mostraram uma tendência de agrupamento semelhante entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos analisadas (Figura 8A e B). As sequências *LTP8* e *13* ficaram agrupadas tanto na filogenia de nucleotídeos quanto de aminoácidos e permaneceram muito próximas no agrupamento UPGMA, baseado nos valores de QR. Estas sequências apresentaram valores de expressão (QR) pouco diferenciados ao longo do tempo de exposição ao estresse e entre os genótipos, sendo os maiores valores para *LTP8* nos genótipos BRS Bojuru e BRS Ligeirinho observados no tempo 96h (1,52 e 3,39 respectivamente). Para *LTP13* o maior valor de QR foi de 2,27 e 1,67 para ambos os genótipos, no tempo de 24 horas de exposição ao sal (Figura 9A e B).

Muito próximo as *LTP8* e *13*, nas árvores filogenéticas, encontra-se *LTP14*. Este gene apresentou valores de QR semelhantes aos observados para *LTP8* e *13* nos tempos 24, 48 e 96 horas em ambos os genótipos. No entanto, no tempo de 72 horas de estresse, *LTP14*, apresentou valores de expressão de 7,28 e 5,46 vezes maiores que o controle, para os genótipos BRS Bojuru e BRS Ligeirinho, respectivamente, motivo pelo qual esse gene tenha sido inserido em um ramo mais distante de *LTP8* e *13*, sendo esta distância mais acentuada no genótipo BRS Bojuru (Figura 9A e B).

Os agrupamentos também salientaram as semelhanças entre as sequências de aminoácidos e nucleotídeos para as *LTP10* e *12* e destas com a *LTP7*. No entanto, os valores de expressão desses genes diferiram entre os genótipos para os dois primeiros genes. A *LTP10* teve uma maior expressão no tempo 48h (3,67) e em 96h o valor de QR

diminuiu para 0,93 no genótipo BRS Bojuru. Para a BRS Ligeirinho o comportamento de expressão foi crescente ao longo dos tempos de exposição ao sal tendo, as 96 h, um QR de 71,1. A *LTP12* teve seu maior aumento de expressão no tempo 48 horas (2,27) para a BRS Bojuru e para a BRS Ligeirinho a maior expressão foi nas 96 horas (21,1) de exposição ao estresse salino. O gene *LTP7*, apesar da alta similaridade na sequência de aminoácidos com as outras duas *LTPs*, teve um padrão de expressão diferenciado, tendo um aumento constante ao longo do tempo chegando a 13,81 nas 96h para a BRS Bojuru e na BRS Ligeirinho de 8,04, no mesmo tempo. Assim, embora *LTP7*, *10* e *12* apresentem alta similaridade entre as suas sequências de aminoácidos, em se tratando do agrupamento com base nos valores de QR, no genótipo BRS Ligeirinho, as *LTPs 10* e *12* ficaram próximas entre si e distantes da *LTP10* (Figura 9B), indicando que, neste caso, embora sejam semelhantes na sequência de aminoácidos, são diferentes funcionalmente nas condições experimentais testadas.

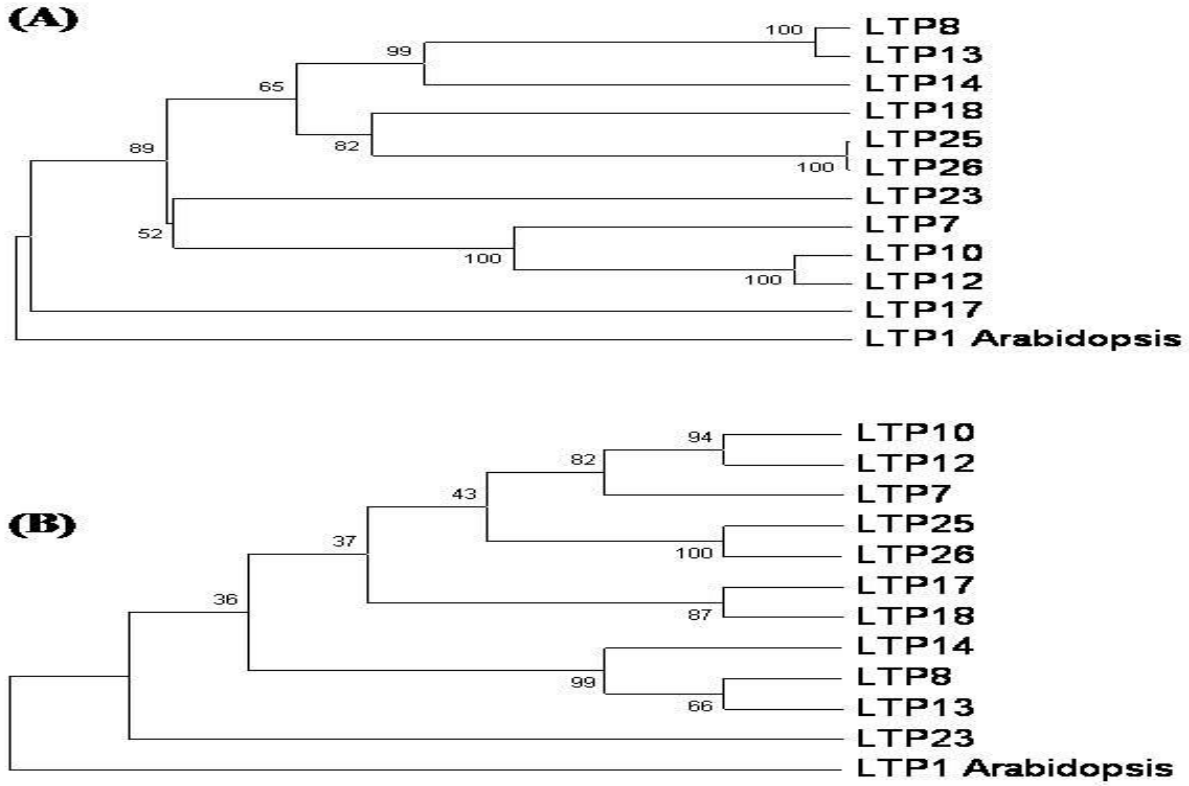

Figura 8. Árvores filogenéticas das sequências de nucleotídeos (A) e de aminoácidos (B) dos genes e proteínas *LTPs*, construídas utilizando o método de agrupamento UPGMA.

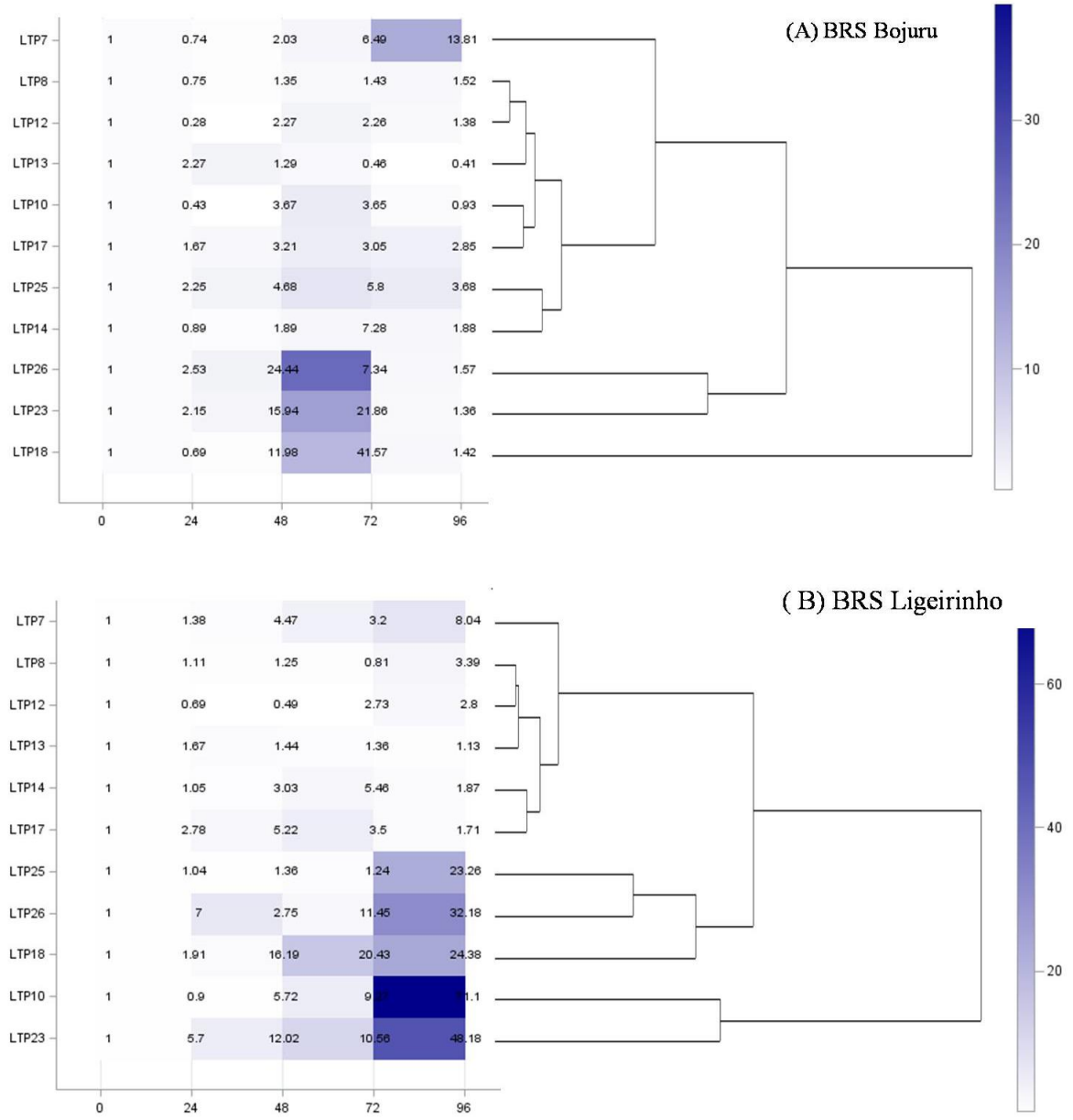

Figura 9. Dendrogramas e *heatmap* resultantes da análise de agrupamento dos genes *LTPs* com base nos valores de quantificação relativa (QR) para os genótipos BRS Bojuru (A) e BRS Ligeirinho (B).

As *LTPs25* e *26* mantiveram-se com alta identidade e similaridade nas árvores filogenéticas. No genótipo sensível, *LTP25* teve um padrão constante de expressão entre os quatro primeiros tempos de exposição ao estresse, porém, nas 96 horas apresentou um pico de expressão de 23,56. Este mesmo genótipo para a *LTP2*6 teve, inicialmente,

um aumento de expressão de 7,0 às 24 horas, seguido de uma diminuição para 2,75 às 48 horas e sucessivo aumento de 11,45 e 32,18 nos últimos dois tempos de estresse. Em razão deste comportamento semelhante de aumento de expressão, principalmente no tempo de 96 horas, estas duas *LTPs*, 25 e 26, ficaram agrupadas no mesmo ramo do dendrograma no genótipo sensível (Figura 9B). No genótipo tolerante, estes genes posicionaram-se em ramos distintos, em função das diferenças nos valores de QR. Para a *LTP25* o valor máximo de QR (5,80) foi observado nas 72 horas, após o estresse, enquanto que para *LTP26* os valores chegaram a 24,44 e 7,34, nos tempos de 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 9A).

Os genes *LTP17* e *18* apresentaram, assim como para suas sequências nucleotídicas, diferenças nos níveis de expressão quando comparados entre si, porém, ambos apresentam aumento de expressão nos dois genótipos. No gene *LTP17*, foi detectado aumento nos níveis de transcritos no tempo de 48 horas de estresse, com valores de QR = 3,21 e 5,22, para BRS Ligeirinho e 3,21 para BRS Bojuru, respectivamente. A *LTP18*, para a BRS Ligeirinho, apresentou um padrão de expressão crescente, chegando, nas 96 horas, a um valor de QR de 24,38. Em BRS Bojuru, observou-se aumento nas 48 e 72h (11,98; 41,57, respectivamente) e um drástico declínio às 96h com QR de 1,42. Estes resultados reforçam os encontrados na análise de correlação, uma vez que *LTP17* e *LTP18*, que apresentam altos valores de expressão, apresentam correlação positiva entre os genótipos e entre si (Figura 7). Estes mesmos genes apresentaram alta semelhança em suas sequências de aminoácidos (Figura 8B), indicando que, nestas condições experimentais, existe uma relação entre as sequências de aminoácidos e a função destas *LTP*s para o estresse salino.

Discussão

A ocorrência, cada vez mais frequente, de água de irrigação salinizada tornou-se um dos principais problemas para a produção de arroz irrigado (Zhang 2007). As plantas, por serem de natureza séssil, desenvolveram um conjunto de mecanismos que lhes permite responder e se adaptar frente a condições de estresses bióticos e abióticos. Assim, conhecer tais mecanismos e identificar genes relacionados com a resposta à salinidade é essencial na identificação de rotas metabólicas envolvidas nos processos de defesa e, consequentemente, no desenvolvimento de estratégias moleculares para a obtenção de plantas de arroz mais tolerantes a essa condição.

Este trabalho apresenta as diferenças de expressão de 11 genes pertencentes à família *LTP1* em dois genótipos de arroz com resposta contrastante ao estresse salino. A partir dos resultados obtidos, foram identificados genes diferencialmente expressos entre os tratamentos e/ou entre os genótipos. Dentre os genes identificados como diferencialmente expressos entre os genótipos, destaca-se *LTP10*, o qual apresentou alto valor de expressão, 70 vezes mais, às 96 horas de estresse, quando comparado com o tratamento controle. Na cultivar BRS Bojuru esse mesmo gene manteve o padrão de expressão durante todos os tempos de exposição ao estresse salino, sendo, portanto, um possível marcador molecular para a identificação de genótipos sensíveis à salinidade.

As respostas de expressão de um mesmo gene frente ao estresse podem variar amplamente em função do estádio de desenvolvimento, tecido ou órgão, tipo e intensidade de estresse, bem como do genótipo. Neste sentido, Tapia et al. (2013), observaram que, em *Lotus japonicus*, expressão do gene *LTP10* foi induzida em folhas e caules submetidos a estresse por seca, porém, foi reprimida em raízes. Chao et al. (2009), ao estudarem a expressão dos genes *Th-LTP10, Th-LTP2, Th-LTP3*, evidenciaram que, em *Tamarix híspida*, a expressão destes genes foi reprimida por

NaCl, mas induzida por $NaHCO_3$.

Os genes *LTP26*, *LTP23* e *LTP18* apresentaram aumento de expressão tanto no genótipo sensível quanto no tolerante, porém com níveis de expressão e tempos de resposta diferenciados entre os genótipos. Uma das diferenças está no fato de que na planta tolerante este gene é requerido após 48 horas de estresse, caindo a valores próximos ao controle às 96 horas, ao contrário da planta sensível, cuja expressão aumenta proporcionalmente à medida que o estresse torna-se mais severo, o que significa que ambas as plantas estão utilizando estes genes no seu processo de aclimatação. Outra diferença está nos níveis de expressão, os quais foram superiores no genótipo sensível. Por outro lado, os genes *LTP8* e *LTP13*, foram os menos induzidos pelo estresse salino nos dois genótipos, apresentando correlação positiva de expressão entre eles, caracterizando-se como genes pouco informativos para identificar genótipos tolerantes ou sensíveis à salinidade.

Os dados obtidos neste estudo, concordam com os encontrados por Wang et al. (2012), os quais, ao avaliarem a expressão de diferentes locos *LTPs* do genoma do arroz em plantas irrigadas com 250 mM de NaCl observaram que existem locos *LTPs* no genoma do arroz que apresentam diferentes respostas frente ao sal. Estes autores identificaram aumento na expressão dos genes *Os11g24070*, *Os04g33920* e *Os05g06780* no período de 12 horas de exposição ao estresse, e que o genes *Os12g02340*, *Os11g02400* e *Os11g02369* não apresentaram alterações nos níveis de expressão.

O envolvimento de genes *LTPs* em resposta ao estresse salino também foi observado em outras espécies, como a cevada (*Hordeum vulgare* L.). Federico et al. (2005), ao estudar a expressão do gene *LTP6*, em plantas de cevada sob estresse salino, por frio e aplicação de ácido abscísico (ABA), observaram aumento da expressão deste

gene mais significativo no estresse salino, quando comparado aos outros tratamentos, chegando a valores de 3,3 vezes contra 2,3 vezes no tratamento com ABA e 1,6 no estresse por frio.

As árvores filogenéticas mostraram uma tendência de agrupamento semelhante entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos analisadas, porém, em alguns casos, como observado com *LTP7, 10* e *12*, os quais apresentam alta similaridade entre as suas sequências de aminoácidos, no agrupamento com base nos valores de QR, no genótipo BRS Ligeirinho, as *LTPs 10* e *12* estão próximas entre si e distantes da *LTP10*, indicando que, neste caso, embora sejam semelhantes na sequência de aminoácidos, são diferentes funcionalmente nas condições experimentais testadas. Chen et al. (2012), ao comparar a expressão de genes da família *MAPK* e a filogenia destes genes em relação às suas sequências de aminoácidos observaram que genes com sequências de aminoácidos muito semelhantes, como *BdMPK7-1/BdMPK7-2*, apresentam respostas de expressão diferenciada entre tecidos de *Brachypodium distachion*.

Neste mesmo sentido, Lan et al. (2009), ao estudarem os padrões de expressão de isoformas de Glutationa S-transferase em *Populus*, obseravaram divergências nos padrões de expressão de genes GSTs dispostos em tandem frente a diferentes tratamentos de estresse, embora tais genes sejam semelhantes em suas sequências de aminoácidos. Por outro lado, observam menos variação nos níveis de expressão nos isoformas não organizadas em tandem. A possível explicação, apresentada pelos autores, para essas diferenças está na duplicação da região promotora destes genes, assim, duplicações em tandem podem alterar a região promotora destes genes, resultando em considerável variação nas respostas de expressão.

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho, reforçados pelos estudos acima citados, reforçam a importância de estudos voltados para famílias gênicas, uma

que isoformas de genes pertencentes a uma mesma família de proteínas apresentam respostas diferentes de acordo com a condição ambiental, estádio de desenvolvimento, genótipo ou tecido avaliado.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos conclui-se que:

1. O gene *LTP7*, apresenta níveis de expressão superiores no genótipo tolerante (BRS Bojuru), sendo, dentre os genes estudados, o mais indicado para ser utilizado como referência para maiores estudos de seleção de marcadores moleculares de genótipos tolerantes à 150mM de NaCl;
2. *LTP10*, dentre os genes estudados, o mais indicado para dar início a estudos de identificação de marcadores moleculares para a seleção de genótipos sensíveis ao estresse salino, visto que o mesmo apresenta níveis de expressão 70 vezes maior no tratamento com 96 horas de exposição ao estresse;
3. *LTP10*, 23 e 26 podem ser utilizados como base para estudos mais aprofundados a fim de identificar marcadores para a seleção assistida de plantas de arroz para o estresse salino por apresentarem resposta de expressão contrastante entre os genótipos e se correlacionarem de maneira negativa;
4. Genes *LTPs1* similares em sequências de nucleotídeos e aminoácidos podem responder de maneira diferenciada frente ao estresse salino.

Bibliografia

Boutrot F, Chantret N and Gautier MF (2008) Genome-wide analysis of the rice and Arabidopsis non-specific lipid transfer protein (nsLtp) gene families and identification

of wheat nsLtp genes by EST data mining. BMC Genomics 9:86 doi:10.1186/1471-2164-9-86.

Chao W, Chuanping Y, Caiqiu G, and Yucheng W (2009) Cloning and expression analysis of 14 lipid transfer protein genes from Tamarix hispida responding to different abiotic stresses. Tree Physiology 29, 1607–1619. doi:10.1093/treephys/tpp082

Carvalho A de O and Gomes VM (2007) Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology- A concise review. Peptides 28:1144-1153.

Chen L, Hu W, Tan S, Wang M, Ma Z, Zhou S, Deng X, Zhang Y, Huang C, Yan G and He G (2012) Genome-Wide Identification and Analysis of MAPK and MAPKK Gene Families inBrachypodium distachyon. Plos One 7: PLoS ONE 7(10): e46744. doi:10.1371/journal.pone.0046744.

Choi AM, Lee SB, Cho SH, Hwang I, Hur CG and Suh MC (2008) Isolation and characterization of multiple abundant lipid transfer protein isoforms in developing sesame (Sesamum indicum L.) seeds. Plant Physiology and Biochemistry, n.46, p.127–139.

Eck RV and Dayhoff MO (**1966**) Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2008). Extent and Causes Salt-affected Soils in Participating Countries – Land and Plant nutrition management service. Disponível em

http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/topic2.htm#top. Acesso em 01 de julho de 2013.

Fitch WM (**1971**) Towards defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. Systematic Zoology 20:406-416.

Federico ML, Kaeppler HF and Skadsen RW (2005) The complex developmental expression of a novel stress-responsive barley Ltp gene is determined by a shortened promoter sequence. Plant Molecular Biology, n. 57, p.35–51.

Gomes EE, Sagot C, Gaillard L, Laquitaine B, Poinssot Y, Sanejouand S and Delrop P (2003) Nonspecific lipid transfer protein genes expression in grape (Vitis sp.) cells in response to fungal elicitor treatments. Molecular Plant-Microbe Interactions, n.16, p.456–464.

Gonorazky AG, Regente MC and Canal L de La (2005) Stress induction and antimicrobial properties of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. Journal of Plant Physiology, n.162, p.618–624.

Hwang EW, Kim KA, Park SC, Jeong MJ, Byun MO and Kwon HB (2005) Expression profiles of hot pepper (Capsicum annum) genes under cold stress conditions. Journal Biosciences, n.30, p.657–667.

Hollenbach B, Schreiber L, Hartung W and Dietz KJ (1997) Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly. Planta, n.203, p.9–19.

Hoagland DR and Arnon DI (1938) The water culture method for growing plants without soil. University of California College of Agriculture, Berkeley.

Jang CD, Kim S, Bu J, Kim S, Lee J, Kim J and Johnson Y (2002) Isolation and characterization of lipid transfer protein (LTP) genes from a wheat–rye translocation line. Plant Cell Report, n.20, p.961–966.

Kimura M (**1980**) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16:111-120.

Kirubakaran SI, Begum SM, Ulaganathan K and Sakthivel N (2008) Characterization of a new antifungal lipid transfer protein from wheat. Plant Physiology and Biochemistry, n.46, p. 918–927.

Lan T, Yang Z-L, Yang X, Liu Y-J, Wang X-R and Zeng Q-Y (2009) Extensive Functional Diversification of the Populus GlutathioneS-Transferase Supergene Family. The Plant Cell 21:3749-3766.

Liu KH and Lin TY (2003) Cloning and characterization of two novel lipid transfer protein I genes in Vigna radiata. DNA Sequence: the journal of DNA sequencing and mapping, n.14, p.420–426.

Mansour MMF, Salama KHA and Al-Mutawa MM (2003) Transport proteins and salt tolerance in plants. Plant Science 164:891-900.

Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Science 7:405-410.

Oshino TM, Abiko R, Saito E, Ichiishi M, Endo M and Kawagishi-Kobayashi A (2007) Premature progression of anther early developmental programs accompanied by comprehensive alterations in transcription during high-temperature injury in barley plants. Molecular Genetics Genomics, n.278, p.31–42.

Pacios LF, Casado CG, Tordesillas L, Palacín A, Monge RS and Perales AD (2012) Computational Study of Ligand Binding in Lipid Transfer Proteins: Structures, Interfaces, and Free Energies of Protein-Lipid Complexes. Computational Chemistry 33: 1831-1844.

Panda SK and Khan MHG (2009) Oxidative Damage and Antioxidant Responses in Greengram (Vigna radiata L.) under short-term Salinity Stress and its Recovery. Journal Agronomy Crop Science, v. 195, p. 442-454.

Pons R, Cornejo MJ and Sanz A (2011) Differential salinity-induced variations in the activity of H^+-pumps and Na^+/H^+ antiporters that are involved in cytoplasm ion homeostasis as a function of genotype and tolerance level in rice cell lines. Plant Physiology and Biochemistry 49:1399-1409.

Tapia G, Morales-Quintana L, Parra C, Berbel A, Alcorta M (2013) Study of *nsLTPs* in *Lotus japonicus* genome reveal a specific epidermal cell member (*LjLTP10*)

regulated by drought stress in aerial organs with a putative role in cutin formation. Plant Mol Biol (2013) 82:485–501. doi 10.1007/s11103-013-0080-x

Vignols F, Wigger M, García-Garrido JM, Grellet F, Kader JC and Delseny M (1997) Rice lipid transfer protein (LTP) genes belong to a complex multigene family and are differentially regulated. Gene 195:177–186.

Wang NJ, Lee C-Ch, Cheng C-S, Lo W-Ch, Yang Y-F, Chen M-N and Lyu P-C (2012) Construction and analysis of a plant non-specific lipid transfer protein database (nsLTPDB). BMC Genomics 13: http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/S1/S9.

Wu G, Robertson AJ, Liu X, Zheng P, Wilen RW, Nesbitt NT, and Gusta LV (2004) A lipid transfer protein gene BG-14 is differentially regulated by abiotic stress, ABA, anisomycin, and sphingosine in bromegrass (Bromus inermis). Journal of Plant Physiology, n.161, p.449–458.

Yeats TH and Rose JKC (2007) The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). Protein Science 17:191-198.

Yubero-Serrano EM, Moyano E, Medina-Escobar N, Munõz-Blanco J and Caballero JL (2003) Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. J. Exp. Bot. 54:1865–1877.

Zhang Q (2007) Strategies for developing green super rice. Proc Natl Acad Sci USA 104:16402–16409. doi:10.1073/pnas.0708013104