

EFICIÊNCIA DE *PRIMERS* RELACIONADOS À GENES DE TOLERÂNCIA DO ARROZ AO ESTRESSE POR BAIXAS TEMPERATURAS

FIN, Silvana Spaniol¹; BEVILACQUA, Caroline Borges²; BRESOLIN, Adriana³; OLIVEIRA, Antonio Costa⁴; ZIMMER, Paulo Dejalma⁵

¹Universidade Federal de Pelotas, graduanda em Agronomia, silvana_fin@hotmail.com; ²Bióloga, mestre em Agronomia, aluna de doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes, Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Fitotecnia, carolinebevi@gmail.com; ³Doutora em Ciências, UFPel, spadribr@hotmail.com.; ⁴Professor adjunto, Departamento de Fitotecnia, UFPel, acostol@terra.com.br; ⁵Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Fitotecnia, Área de Sementes. dejalma@msn.com

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o cereal mais consumido no mundo, constituindo-se a base da alimentação de 2/3 da população do planeta. Entre os fatores que podem prejudicar a produtividade da cultura estão os estresses abióticos como as baixas temperaturas, especialmente em estágios iniciais de desenvolvimento. A busca pela tolerância é a principal solução para prejuízos causados pelo frio em arroz (SERAFIM, 2003).

As respostas biológicas são controladas pela regulação da expressão gênica, sendo que atualmente existe um grande número de estratégias disponíveis para analisar a expressão diferencial de genes de interesse. A técnica de PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR) é considerada mais sensível que inúmeras outras que necessitam da proteção do RNA contra RNases (BUSTIN, 2000), além dessas, também necessitam de quantidade maior de amostra inicial.

Nessa técnica a quantidade de produto amplificado é proporcional a acumulação de fluorescência (HIGUCHI et al., 1993) e a eficiência dessa amplificação deve ser comparada entre as amostras (FREEMAN et al., 1999). A acurácia desse método é dependente da análise da curva padrão gerada a partir de diluições do cDNA com sua concentração inicial conhecida e da qualidade do RNA (PEIRSON et al., 2003). Além disso, a metodologia de qRT-PCR que utiliza SYBR Green é de baixo custo, rápida e confiável em comparação com sonda fluorescente (STANKOVIC e CORFAS, 2003).

Os genes constitutivos que apresentam uma alta estabilidade na expressão podem ser utilizados como controles, onde os primers utilizados para a amplificação dos genes a serem investigados devem apresentar uma eficiência similar aos primers utilizados para a amplificação desses genes constitutivos (JAIN et al, 2006; LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Para tanto, a etapa de desenho dos primers merece atenção para uma realização de qRT-PCR eficiente.

O objetivo desse estudo, foi avaliar a eficiência na amplificação de primers relacionados aos caracteres de tolerância ao frio nas fases iniciais do arroz, os quais poderão ser utilizados na técnica de qRT-PCR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenho dos primers relacionados ao genes de resposta ao estresse pelo frio no arroz (Tabela 1), foi realizado o alinhamento global utilizando-se as

seqüências de interesse, com auxílio do programa BLASTn –NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do programa Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), observando os seguintes parâmetros:

- temperatura de anelamento (60-65°C);
- tamanho do *amplicon* (50-150 pb);
- porcentagem de GC (40-60%);
- ausência de dimerização.

Os reagentes utilizados para a realização das ampliações foram: DNTPs (5mM), buffer (10x), Cloreto de magnésio (50mM), SYBR Green (1X), Taq Platinum, ROX, primer e o template (cDNA). Esse cDNA foi obtido a partir da extração de RNA de mesocótilo de arroz irrigado após 2 semanas da semeadura.

O seguinte programa de amplificação foi utilizado: Estágio 1= 50°C por 2 min; Estágio 2= 95°C por 10 min; Estágio 3= 40 ciclos - 95°C por 15 seg / 60°C por 1 min (onde ocorrerá a leitura); Estágio 4= estágio adicional na qual é efetuada a dissociação do SYBR - 95°C por 15 seg. / 60°C por 1 min / 95°C por 15 seg. Os dados foram processados no software 7500 v.2.0.1.

Para a obtenção da curva de dissociação (Curva de Melt) foi utilizado o Programa da Applied Biosystems juntamente com o termociclador 7500 Fast (Quadro 1). A seguir se realizou da análise do coeficiente de determinação e averiguação do comportamento das amostras sob quatro pontos de diluição.

Tabela 1. Genes expressos em arroz (*Oryza sativa*) quando submetidos a estresses abióticos

Gene	Acesso	Estresse envolvido	Referências
ASR1 e ASR1d	AF 039573	alumínio	Arenhart, 2008
OsDREB1	AY258283	frio	Tian et al., 2005
OsDREB1A	AF300970	frio	Dubouzet et al., 2003
OsCDPK7	AB042550	Sal	Saijo et al., 2000
Clone JRC 2606	BP432999	frio	Rabbani et al., 2003
Clone JRC 0937	BP432974	frio	Rabbani et al., 2003
GERMIN	Os08g08970	ABA	Cheng et al., 2007

Após o processo de amplificação do produto, o que é proporcional à acumulação de fluorescência, foi investigada a eficiência dos *primers* (WATSON et al, 1993).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Fig. 1 estão representadas as curvas de dissociação dos *primers* testados no estudo. A Curva de Melt demonstrou que a maioria dos *primers* obteve apenas um pico (Fig.1), o que indica a provável presença de apenas uma cópia do fragmento no genoma de arroz, o que se torna bom indício. Foram utilizadas diluições seriadas do cDNA (1, 1:5, 1:25 e 1:125), a última diluição utilizada (1:125) não apresentou ampliações o que determina a utilização de no máximo a diluição de 1:25 dos cDNAs a serem posteriormente testados quanto a quantificação relativa. Além disso, os *primers* desenhados para OsCDPK7 e OsDREB1 tanto no valor da eficiência dos primers (Tab. 2) quanto a dissociação desses após a amplificação (Fig.1 G e H) demonstram sua maior inespecificidade em produzir apenas um amplicon em relação aos demais testados.

Os valores de eficiência dos *primers* estão apresentados na Tab. 2. Os *primers* JRC 2606 e JRC 0937 se mostraram os mais eficientes, pois apresentaram seus valores de eficiência mais próximos de 2. Valores para eficiência dos *primers* devem ser o mais próximo possível de 2, com tolerância de 10% para o desvio, pois isso significa que o amplicon duplica sua quantidade durante a fase geométrica (exponencial) da PCR, ou seja, que a PCR foi 100% eficiente.

Figura 1. Curva de dissociação para os oito *primers* testados assim como o endógeno estudado (Beta-actina). A-ASR1, B-ARS1d, C-b-actina, D-GERMIN, E-JRC0937, F-JRC2606, G-OSCDPK7, H-OsDREB1, I-OsDREB1A.

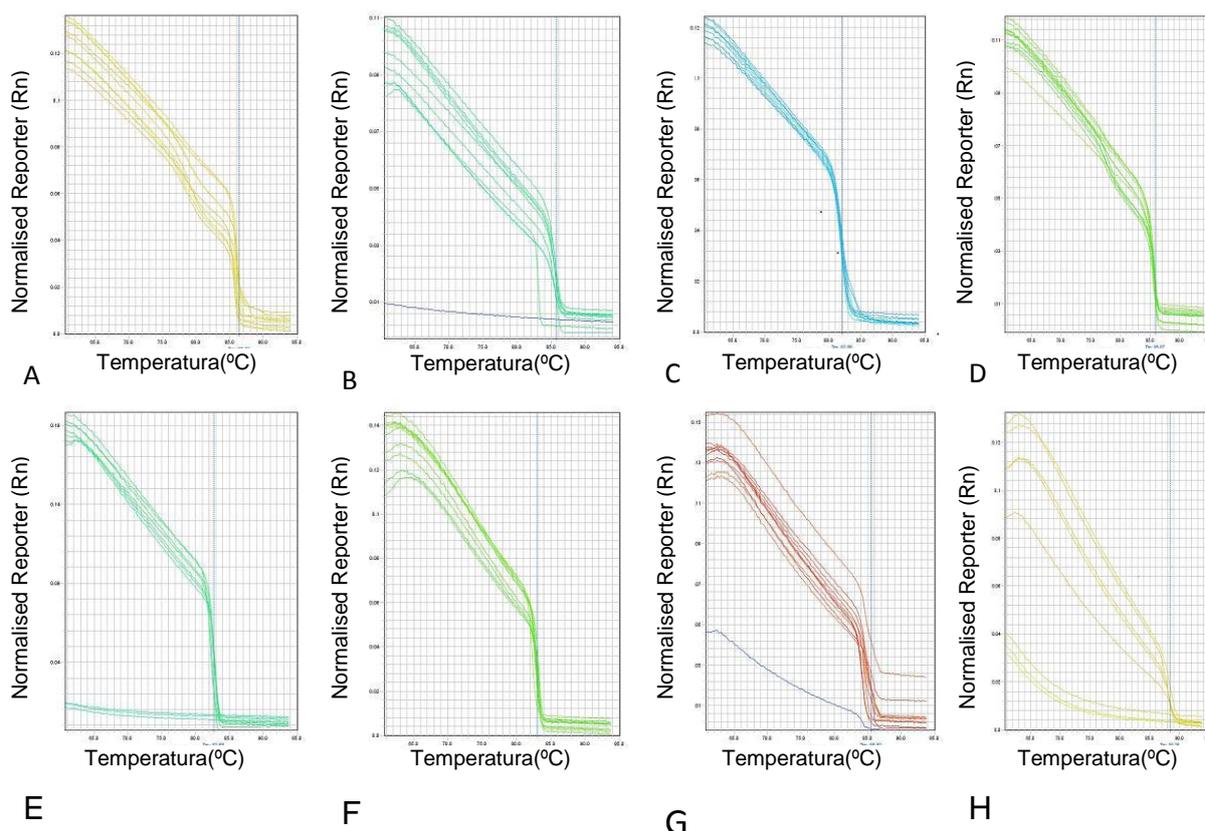


Tabela 2. Eficiência dos *primers*, calculada a partir do valor do Slope (inclinação da curva padrão gerada pelos dados: log da concentração das amostras x Ct (Threshold Cycle, ou seja, ciclo em que a curva de amplificação intercepta o limite, podendo ser comparado aos demais) e coeficiente de determinação para os *primers* testados.

Gene	Eficiência do <i>primer</i>	R ²
ASR1	4.602,6	0,901
OsDREB1A	10,1	0,312
Germin	1,0	0,971
ASR1d	1,0	0,136
OsCDPK7	417.531.893	0,005
OsDREB1	9,1	0,476
JRC 2606	2,5	0,916
JRC 0937	2,4	0,902
B-actina	4,1	0,778

Os *primers* que se destacaram, são os denominados JRC 2606 e JRC 0937 por apresentaram os melhores resultados para eficiência, além de aceitáveis valores

do coeficiente de determinação. Os *primers* Germin e ASR1 apresentaram bons resultados de R² e também destacaram-se (Tab. 2).

4 CONCLUSÃO

Os *primers* testados para reações de qRT-PCR, apresentam diferentes níveis de eficiência indicando a necessidade de testes com maior número destes, antes da validação para caracteres de tolerância à estresses abióticos em arroz em estádios iniciais de desenvolvimento sob estresse por frio.

5 REFERÊNCIAS

- BUSTIN S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**. 25, p.169–193. 2000.
- FREEMAN, D., & GARETY, P. A. Worry, worry processes and dimensions of delusions: An exploratory investigation of a role for anxiety processes in the maintenance of delusional distress. **Behavioural and Cognitive Psychotherapy**, 27, p.47–62. 1999.
- HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G, and WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Bio/Technology** 11, p.1026-1030. 1993.
- JAIN, N., R. Koopar and S. Saxena,. Effect of accelerated ageing on seeds of radish (*Raphanus sativus* L.). **Asian Journal of Plant Sciences**., 5, p.461-464.2006.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.
- PEIRSON, S.N., BUTLER, J.N., FOSTER, R.G. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. **Nucleic Acids Res** 31(14): e73. 2003.
- SERAFIM, D. C. S. **Mapeamento de QTLs para tolerância ao frio e características de importância agrônômica em arroz**. Dissertação (mestrado) em Fitotecnia / Área de concentração Plantas de Lavoura, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.
- WATSON, R. et al. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. **Nature Biotechnology** 11, p.1026–1030, 1993.