

ANÁLISE DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM PLANTAS DE ARROZ SOB EXCESSO DE FERRO

Artur Teixeira de Araujo Junior¹; Marcelo Nogueira do Amaral²; Luis Willian Pacheco Arge³; Danyela de Cássia Oliveira⁴; Solange Ferreira da Silveira Silveira⁴; Daniel da Rosa Farias⁵; Railson Schreinert dos Santos⁵; Eugenia Jacira Bolacel Braga⁶; Luciano Carlos da Maia⁷; Antonio Costa de Oliveira⁷

Palavras-chave: RNA-seq, BRS Querência, transcriptoma

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.), cereal de grande importância econômica e social, não raramente tem sua produtividade comprometida por condições de toxidez por excesso de ferro, um estresse ocasionado por uma combinação de características edáficas e de cultivo (SAHARAWAT, 2004).

Dentro deste contexto é importante destacar que ao longo do tempo as plantas vêm desenvolvendo respostas moleculares dinâmicas para se adaptarem a estas tensões. Tais respostas permitem sua sobrevivência em condições ambientais nem sempre favoráveis. Neste processo adaptativo alguns genes, como os fatores de transcrição (FTs), os quais funcionam como reguladores de inúmeros outros genes, têm um importante papel o qual é relatado nos mais diversos estudos (KASUGA et al., 1999; NAKASHIMA et al., 2009).

Desta forma, entender quais FTs são diferencialmente expressos em plantas submetidas a estresses auxilia na identificação de genes responsáveis pelo aumento da tolerância a tal estresse e conseqüentemente o melhoramento genético. O presente estudo analisa genes putativos FTs diferencialmente expressos por plantas de arroz da cultivar BRS Querência submetida a toxidez por excesso de ferro.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de arroz cv. BRS Querência foram germinadas em câmara de crescimento durante sete dias com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2 °C. Após esse período, as plântulas foram transferidas para bandejas plásticas contendo areia previamente lavada, e mantidas em casa de vegetação com irrigação alternada (intervalos de 2 dias) com solução nutritiva de Yoshida (YOSHIDA et al., 1976) e água. Ao atingirem o estágio de plântula (V3) foram submetidas a toxidez por excesso de ferro com solução nutritiva adicionada de 300 mg L⁻¹ de Fe⁺², conforme descrito por Elec et al. (2013), durante 24 horas. Plantas não tratadas foram mantidas apenas com solução nutritiva, sendo utilizadas como controle. Posteriormente, tecidos foliares foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados à -80°C para posterior extração de RNA.

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de folhas utilizando *Plant RNA Reagent Purelink*®. Para o preparo das bibliotecas foi utilizado o kit *TruSeq RNA Sample Preparation v2* (Illumina®), seguindo as recomendações do fabricante. O sequenciamento das bibliotecas foi do tipo *paired-end* 2x100 (duas leituras de 100 pb) realizado na plataforma HiSeq 2500 (Illumina®).

Para a visualização e identificação da qualidade das *reads*, foi utilizado o programa FastQC Ver. 0.11.2 (ANDREWS, 2010). Já o Trimmomatic Ver. 0.32 (BOLGER et al., 2014) foi utilizado para a remoção das bases com baixa qualidade e dos adaptadores de cada biblioteca. Após, as *reads* foram mapeadas no genoma de referência de *Oryza sativa* cv. Nipponbare (IRGSP build 4.0) utilizando o programa TopHat 2.0.11 (TRAPNELL et al., 2009). Após o alinhamento, os genes diferencialmente expressos foram submetidos a análise de enriquecimento, utilizando o programa BLAST2GO Ver. 2.7.2, onde após a

¹Eng. de Bioprocesso e Biotecnologia, Estudante de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, E-mail: arturtaj@hotmail.com

²Biólogo; Estudante de Doutorado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

³Tecn. em Agropecuária; Estudante de Doutorado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

⁴Eng. Agr., Estudante de Doutorado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

⁵Eng. Agr., Pós-Doutorado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

⁶Professora Dep. de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

⁷Professor Dep. de Fitotecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

anotação, os termos de ontologia genica (GOs) sobre-representados foram identificados utilizando o teste exato de Fisher ($p < 0,01$), corrigido pelo método FDR (*false discovery rate*) com $p < 0,05$ (CONESA et al., 2005). Além disso, para visualizar mudanças gerais no metabolismo relacionadas aos estresses, se utilizou o programa MapMan Ver. 3.5.1.R2 (THIMM et al., 2004), enquanto que a ferramenta PRIN (GU et al., 2011) foi utilizada para a visualização dos resultados da rede de interação proteína-proteína

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados 31 putativos FTs expressos diferencialmente (Figura 01, letra A). Sendo que 13 destes foram induzidos (com intervalo de *fold-change* de 0,4056 para o gene Os03t0284400 à 1,3911 para o gene Os03g0764600) e 18 reprimidos (com intervalo de -1,252 para Os05g0429900 à -0,388 para Os06g0603000). Quando analisadas as famílias dessas proteínas a que obteve maior frequência foi a MYB, com quatro proteínas, seguida pela família bZIP, CCT e AP2, todas com duas proteínas cada. Recentes estudos confirmam resultados obtidos, comprovando que as famílias MYB, bZIP, CCT AP2 estão diretamente envolvidas não só na regulação de processos de desenvolvimento da planta, mas também em mecanismos de resposta a vários tipos de estresses bióticos e abióticos (KATIYAR et al., 2012; RASHID et al., 2012; NIJHAWAN et al., 2008).

A análise de ontologia desses genes demonstra que os principais processos aos quais eles parecem estar atrelados são os de regulação de transcrição (22 ocorrências) e de regulação positiva da transcrição (oito ocorrências). Na classificação quanto a componente celular temos localização no núcleo e no cloroplasto, foram os locais de maior incidência. Já em relação às principais possíveis funções temos que as mais frequentes foram para a ligação ao DNA (24 ocorrências) e, posteriormente, para ligação em proteínas (14 ocorrências), duas atividades típicas de FTs.

Verificando uma possível interação proteína-proteína observou que existem dados de cinco proteínas diferencialmente expressas do experimento que possuem a função fatores de transcrição realizam sete correlação de coexpressão (Tabela 01), tendo uma variação da coexpressão de -0,1169 até 0,7147. Analisando as diferentes rotas metabólicas nas quais estas proteínas parecem estar envolvidas, conseguimos desenvolver uma rede de coexpressão de metabolismo (Figura 01, letra C). Nesta mesma figura se verifica que nesse experimento os genes do metabolismo de lipídeos e do nitrogênio apresentam coexpressão negativa com o os fatores de transcrição, enquanto estes mesmos FTs apresentam coexpressão positiva com genes relacionados ao transporte de proteínas e de sinalização celular. Além disso, existe a presença de uma proteína a qual não tem papel reconhecido ou predito no metabolismo. Esta proteína apresenta coexpressão positiva com os FTs, merecendo uma maior atenção.

Tabela 01. Resultados encontrados para a análise de co-expressão gênica envolvendo FTs diferencialmente expressos em arroz sob estresse por excesso de ferro.

Genes coexpressos	Intensidade da coexpressão
Os09g0277800 - Os03g0284400*	-0,1169
Os01g0757900 - Os03g0284400*	-0,0434
Os01g0535900 - Os03g0284400*	0,4463
Os03g0332700* - Os01g0127300	0,7068
Os02g0618200* - Os11g0157600*	0,7147
Os03g0179000* - Os01g0772700	0,126
Os03g0179000* - Os01g0834500	0,3569

*Fator de transcrição putativo.

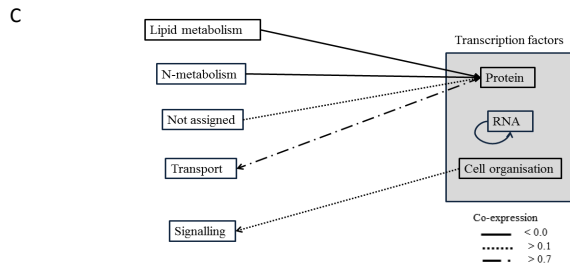
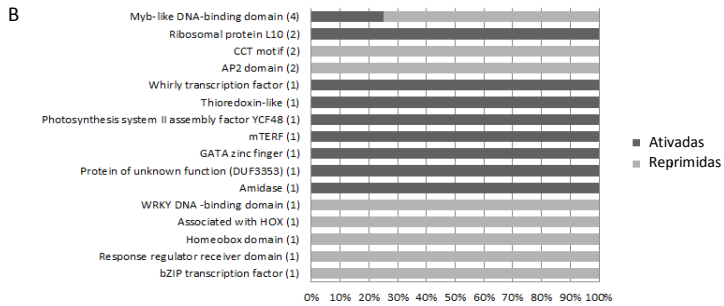
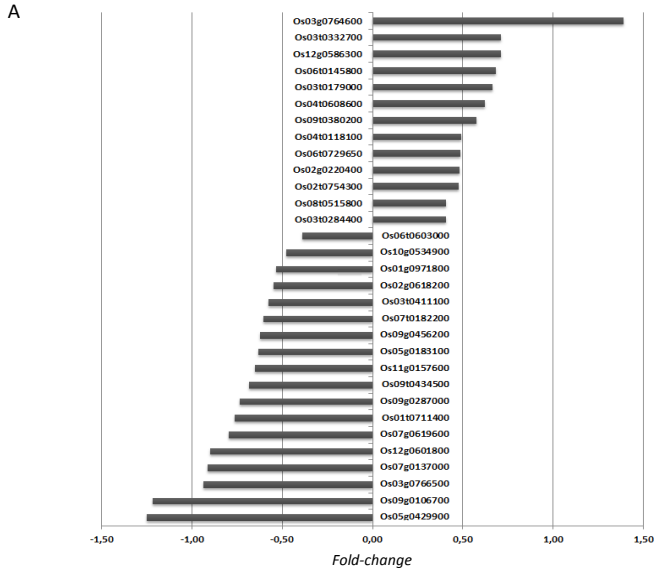


Figura 01. Análise dos fatores de transcrição diferencialmente expressos. A) *Fold-change* dos genes. B) Motivos encontrados nos diferentes fatores de transcrição diferencialmente expressos, tendo em parênteses a ocorrência total desses motivos. C) Rede de coexpressão de metabolismo.

CONCLUSÃO

A compreensão da resposta transcricional inicial de uma planta tolerante a um determinado estresse é fundamental para entender os mecanismos de adaptação a estresses, ajudando na identificação de segmentos de DNA potencialmente úteis para engenharia genética e desenvolvimento de marcadores. Neste experimento o gene Os03g0764600 teve maior expressão diferenciada positivamente, sendo importante entender as possíveis alterações provocadas por esse gene devido sua alta expressão. Quando analisamos os bancos de dados do programa PRIN não encontramos coexpressão desse gene, sendo este, outro fator para procurar realizar mais estudos sobre esse gene.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, S. FastQC. A quality control tool for high throughput sequence data. **Babraham Bioinformatics**. Acessado em: 16 de junho de 2015. Online. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- BOLGER, A. M. et al. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, Reino Unido, v.30, n.15, p.2114-2120, 2014.
- Conesa A. et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**.21:3674-76; 2005.
- ELEC V. et al. Maintaining elevated Fe²⁺ concentration in solution culture for the development of a rapid and repeatable screening technique for iron toxicity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Soil**.372:253-64; 2013.
- GU H.B. et al. PRIN: a predicted rice interactome network. **BMC Bioinformatics**, 2011.
- KASUGA, M. et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **NatBiotechnol**. 17: 287–291; 1999.
- KATIYAR, A. Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and Arabidopsis. **BMC Genomics**. Oct 10;13:544, 2012.
- NAKASHIMA, K. et al. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses, **Plant Physiol**. 149, 88–95, 2009.
- NIJHAWAN, A. et al. Genomic Survey and Gene Expression Analysis of the Basic Leucine Zipper Transcription Factor Family in Rice. **Plant Physiology**. vol. 146, n. 2 333-50, 2008.
- RASHID, M. et al. AP2/ERF Transcription Factor in Rice: Genome-Wide canvas and syntenic Relationships between Monocots and eudicots. **Evolutionary Bioinformatics**. 8 321–355; 2012.
- SAHRAWAT, K.L. Iron toxicity in Wetland rice and role of other nutrients. **Journal of Plant Nutrition**, v.27, p.1471-1504; 2004.
- THIMM O. et al. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. **Plant J**.37:914-39; 2004.
- TRAPNELL, C. et al. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, Reino Unido, v. 25, n. 9, p. 1105-1111, 2009.
- YOSHIDA, S. et al. Laboratory manual for physiological studies of rice. **The Philippines: International Rice Research Institute (IRRI)**,3v, 1972.