

ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE ARROZ SUBMETIDO AO ESTRESSE SALINO NOS ESTÁDIOS VEGETATIVO E REPRODUTIVO

Marcelo Noqueira do Amaral¹; Priscila Ariane Auler²; Luis Willian Pacheco Arge³; Tatiana Rossatto²; Alexandre Pereira Leivas⁴; Gabriela dos Santos Rodrigues⁴; Antonio Costa de Oliveira⁵; Luciano Carlos da Maia⁶; Eugenia Jacira Bolacel Braga⁷

Palavras-chave: Ontologia Gênica, *Oryza sativa* L., RNA-seq

INTRODUÇÃO

A salinização do solo e da água de irrigação, durante as fases de estabelecimento da cultura do arroz (*Oryza sativa* L.) e, principalmente, na fase reprodutiva estão intimamente relacionados com a variabilidade nos níveis de produtividade (ZHU, 2001).

O controle genético da tolerância à salinidade é uma característica quantitativa, envolvendo uma rede gênica de vários *loci* distribuídos em diferentes regiões do genoma do arroz, os quais, uma vez ajustados, podem mitigar o efeito do estresse, levando a um ajustamento celular e tolerância da planta (FOWLER, 2004). Assim, o conhecimento do transcriptoma de cultivares de arroz, submetidas a este tipo de estresse, pode auxiliar a elucidar quais vias metabólicas são alteradas e quais são as principais respostas moleculares das plantas em tais condições, permitindo a prospecção de marcadores genéticos que auxiliarão na seleção e obtenção de cultivares com maiores níveis de tolerância a estas condições.

A tecnologia de sequenciamento massivo de RNAs (RNA-seq) permite caracterizar o transcriptoma completo de um tecido sob determinada condição. O uso desta tecnologia tem gerado uma grande quantidade de dados, tais como os níveis de expressão gênica, diferenças em regiões 3'UTRs/5'UTRs (região não traduzida), CDSs (região codificadora), regiões de *splicing* e SNPs (Polimorfismo de Nucleotídeo Único) (TRAPNELL et al., 2010). Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil transcricional de uma cultivar de arroz, submetida ao estresse salino durante o período vegetativo e/ou reprodutivo, na busca de informações sobre os mecanismos de tolerância a esta condição ambiental.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes do genótipo de arroz BRS Ligeirinho foram germinadas em rolo de papel em câmara de crescimento do tipo BOD, por sete dias. As plântulas foram transferidas para vasos plásticos contendo areia (previamente lavada com água e ácido clorídrico 1%), sendo mantidas em casa de vegetação com umidade relativa do ar de 70%, temperatura de 25±2°C e irrigação diária, alternada com água e solução nutritiva de Yoshida (1976).

Quando as plantas atingiram o estágio de desenvolvimento V4, foram divididas em dois grupos. No primeiro grupo as plantas não foram submetidas ao pré-tratamento com sal. O segundo grupo foi submetido ao pré-tratamento com solução de Yoshida contendo 150 mM de NaCl. Os vasos foram colocados sobre bandejas plásticas para manter o nível de solução.

Após 48 horas, a areia foi lavada com água destilada para a retirada do excesso de sais, e posteriormente se mantiveram com irrigação normal, até chegarem ao período reprodutivo. Ao atingirem o período reprodutivo (R1-R2), um grupo de plantas foi novamente

¹ Doutorando em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas, Avenida República 229, theoamaral@hotmail.com

² Doutorandas em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas

³ Doutor em Agronomia, Laboratório Nacional de Computação Científica

⁴ Graduandos em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas

⁵ Professor Titular, Universidade Federal de Pelotas

⁶ Professor Adjunto, Universidade Federal de Pelotas

⁷ Professora Associada III, Universidade Federal de Pelotas

submetido ao estresse salino. Em vista disso, foram designadas quatro condições experimentais: C: somente solução nutritiva durante todo ciclo, sendo o controle; PTV: pré-tratamento no vegetativo e sem salinidade no reprodutivo; PTV+R: pré-tratamento no vegetativo e subsequente estresse salino no reprodutivo; NPT: sem pré-tratamento no vegetativo e com salinidade no reprodutivo. O delineamento experimental foi em DIC, com três repetições biológicas por condição experimental, sendo cada unidade experimental representada por um vaso contendo seis plantas. As amostras foram coletadas após 48 horas de estresse no estádio reprodutivo.

O RNA total foi extraído de 100 mg de folhas utilizando *Purelink Plant RNA* (Invitrogen) e preparado para sequenciamento com o *kit TruSeq RNA Sample Preparation V2* (Illumina), de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade das bibliotecas foi avaliada com o equipamento *Agilent 2100 BioAnalyzer* (Agilent Technologies), e o *kit Agilent DNA 1000* (Agilent). Duas repetições por condição experimental foram submetidas ao sequenciamento do tipo *paired-end* (2x100pb) utilizando a Plataforma HiSeq 2500 (Illumina).

O programa Trimmomatic Ver. 0:32 (BOLGER et al., 2014) foi utilizado para remover adaptadores e bases de baixa qualidade de cada biblioteca. As *reads* foram mapeadas contra o genoma de referência de *Oryza sativa*, cv. Nipponbare (IRGSP build 1.0), do Rice Genome Annotation Project Ver. 7, pelo software TopHat Ver. 2.0.11 (TRAPNELL et al., 2009). O software HTSeq 0.5.3 (ANDERS et al., 2015) foi usado para a contagem bruta das *reads*. A identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs) foi realizada usando o software R 3.1.0 com o pacote edgeR 3.8.5 (ROBINSON et al., 2010), do repositório Bioconductor. Os níveis de expressão foram calculados pela contagem por milhão (CPM) > 1 e normalizados pela média dos valores de M (TMM), considerando os genes expressos diferencialmente com taxa de falsas descobertas (FDR) < 0,01. A análise de qualidade de alinhamento das *reads* contra o genoma referência foi realizada com o programa Qualimap Ver. 2.2 (OKONECHNIKOV; CONESA; GARCÍA-ALCALDE, 2015).

Os DEGs foram submetidos à análise de enriquecimento de termos GO (ontologia gênica) com um script customizado em R e com anotação do MSU Ver. 7, com ponto de corte FDR < 0,05. Os termos GO sobre-representados foram submetidos à web ferramenta REVIGO (SUPEK et al., 2011) para visualização das relações entre os termos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sequenciamento de RNA gerou aproximadamente 226 milhões de *reads*, em quatro bibliotecas (C, PTV, PTV+R e NPT). O mapeamento das *reads* contra o genoma de referência (cv Nipponbare - IRGSP 1.0) resultou em uma média de 82,22% de mapeamento, com variação de 81,92 a 82,71% para o Controle e PTV, respectivamente.

Em relação ao número de genes diferencialmente expressos (DEGs), a condição PTV+R apresentou o menor valor (111), sendo 20 deles regulados positivamente (*up-regulated*) e 91 regulados negativamente (*down-regulated*), seguida por NPT (172), com 59 DEGs *up-regulated* e 123 *down-regulated*. PTV apresentou o maior número de DEGs (293), com 105 *up-regulated* e 188 *down-regulated*. Além disso, a condição PTV apresentou 139 DEGs exclusivos, enquanto NPT e PTV+R apresentaram número inferiores, com 50 e 24 DEGs, respectivamente. Um total de 49 DEGs foram comuns as três condições (Figura 1). Segundo Ding et al. (2014), o critério operacional para a memória transcricional é que as respostas transcricionais a condições de estresse semelhantes devem ser diferentes. Consequentemente, estes 24 genes exclusivos para PTV+R exibem memória de transcrição ao estresse salino.

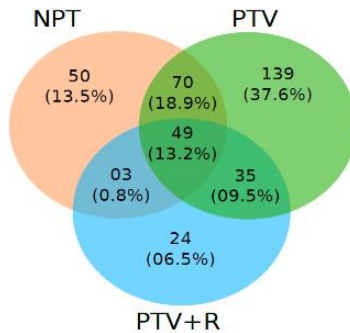


Figura 1 - Diagrama de Venn baseado nas comparações entre as condições de estresse.

Para uma visualização detalhada de grandes conjuntos de genes, foi utilizada a anotação funcional por termos de GO (Ontologia Gênica), permitindo a identificação de diferentes processos alterados em cada condição. Para as condições PTV e PTV+R, *response to stress* (GO:0006950) e *response to biotic stimulus* (GO:0009607) foram os dois termos de GOs mais sobre-representados para a classe de Processos Biológicos (Figura 2a e 2g, respectivamente), enquanto NPT apresentou maior número de termos de GOs sobre-representados, sendo que *response to stress* (GO:0006950), *metabolism* (GO:0008152), *oxidation-reduction process* (GO:0055114) e *carboxylic acid metabolic process* (GO:0019752) foram os principais (Figura 2d). Em um estudo com duas cultivares contrastantes à salinidade, o termo de GO *response to stress* (GO:0006950) foi o mais representativo para a cultivar sensível, corroborando os resultados obtidos nesse estudo, visto que BRS Ligeirinho é considerada como sensível à salinidade (JYANG et al., 2013). A condição de NPT também apresentou os termos de GOs *cation transport* (GO:0006812) e *potassium ion homeostasis* (GO:0055075),

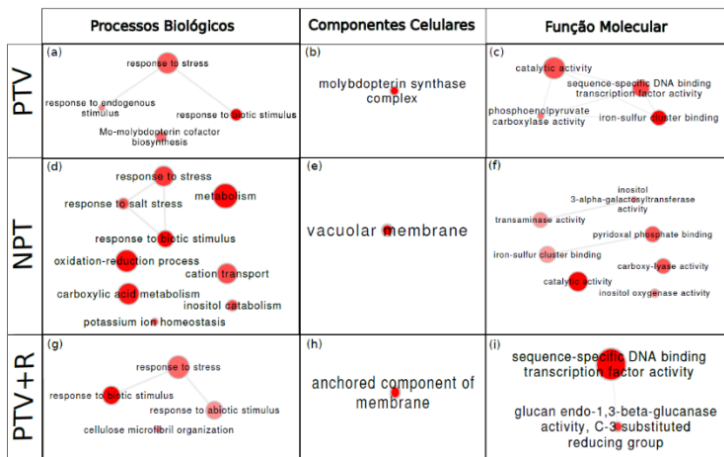


Figura 2 – Representação gráfica utilizando o REVIGO dos termos de GOs sobre-representados em cada condição. (a) PTV - Processos Biológicos, (b) PTV – Componentes Celulares, (c) PTV – Função

Molecular, (d) NPT – Processos Biológicos, (e) NPT – Componentes Celulares, (f) Função Molecular, (g) PTV+R – Processos Biológicos, (h) PTV+R – Componentes Celulares e (i) PTV+R – Função Molecular.

A classe de Componentes Celulares foi a que apresentou menor número de termos de GOs sobre-representados nas três condições, sendo *molybdopterin synthase complex* (GO:0019008) para a condição PTV (Figura 2b), *vacuolar membrane* (GO:0005774) para NPT (Figura 2e) e *anchored component of membrane* (GO:0031225) para PTV+R (Figura 2h). Para a classe de Função Molecular, *catalytic activity* (GO:0003824) foi o termo de GOs mais sobre-representado para as condições PTV (Figura 2c) e NPT (Figura 2f), e *sequence-specific DNA binding transcription factor activity* (GO:0003700) para PTV+R (Figura 2i). Esses dois termos de GOs normalmente estão associados ao estresse salino, e são responsáveis por reações bioquímicas e pela regulação da expressão gênica (WANG et al., 2016).

CONCLUSÃO

A condição PTV apresentou um maior número de genes diferencialmente expressos, entretanto a condição NPT apresentou regulação mais complexa, evidenciada pelo maior número de termos de GOs sobre-representados. A diferença na resposta entre NPT e PTV+R evidenciou que o pré-tratamento no estágio vegetativo influencia na resposta ao estresse subsequente no estágio reprodutivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOLGER, A. M. et al. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, August 2014.
- DING, Y. et al. Dehydration stress memory genes of *Zea mays* comparison with *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biology**, Londres, v. 14, p. 141, May 2014.
- FLOWERS, T. J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 396, p. 307-319, February 2004.
- JYANG, S. et al. Genome-Wide Survey on Genomic Variation, Expression Divergence, and Evolution in Two Contrasting Rice Genotypes under High Salinity Stress. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 5, n. 11, p. 2032-2050, October 2013.
- OKONECHNIKOV, K. et al. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, Oxford, v.32, n. 2, p. 292-294, January 2016.
- ROBINSON, M. D. edge R: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 139-40, January 2010.
- SUPEK, F. et al. (2011) REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 7, p. e21800, July 2011.
- TRAPNELL, C. et al. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 9, p. 1105-1111, May 2009.
- TRAPNELL, C. et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nature Biotechnology**, London, v. 28, n. 5, p. 511-515. May 2010.
- WANG, W. et al. Complex molecular mechanisms underlying seedling salt tolerance in rice revealed by comparative transcriptome and metabolomic profiling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 67, n. 1, pp. 405-419, January 2016.
- YOSHIDA, S.; FORNO, D. A.; COCK, J. H.; GOMEZ, K. A. (Ed.). **Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice**. Laguna, Philippines: The International Rice Research Institute, 1976.
- ZHU, J. K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, New York, v. 6, n. 2, p. 66-71, February 2001.