

## Validação por qPCR de genes diferencialmente expressos em milho em resposta ao estresse hídrico.

**Beatriz de Almeida Barros<sup>(1)</sup>; Andrea Almeida Carneiro<sup>(2)</sup>; Paloma Alessandra Alves<sup>(3)</sup>; Raquel Oliveira Moreira<sup>(3)</sup>; Roberto Willians Noda<sup>(2)</sup>; Newton Portilho Carneiro<sup>(2)</sup>**

<sup>(1)</sup> Analista de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG; <sup>(2)</sup> Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG; <sup>(3)</sup> Estagiária, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. [newton.carneiro@embrapa.br](mailto:newton.carneiro@embrapa.br)

**RESUMO:** O estresse hídrico é um dos principais fatores que limita a produção agrícola. Déficit de água reduz o rendimento da cultura principalmente nos estádios reprodutivos. O milho é uma cultura importante para a segurança alimentar global que está sendo amplamente cultivada em áreas tropicais e subtropicais sob condições de sequeiro. A tolerância à seca é uma característica complexa e afeta as respostas de genes em muitos processos biológicos em plantas. Nesse trabalho foram comparados nível de expressão de genes de raiz de espécies de milho contrastantes para a tolerância ao estresse hídrico e em duas condições hídricas por RNAseq e qPCR. O RNA total foi extraído de raízes de plantas de milho mais tolerante, na presença (50% menos irrigado) e ausência (100% irrigado - controle) do estresse. Os cDNAs foram construídos, sequenciados e analisados utilizando softwares na plataforma Galaxy da Embrapa Informática Agropecuária. Genes com diferenças de expressão superior a dez vezes em condições contrastantes em análise de RNAseq e de baixo número de cópia forma submetidos ao qPCR. Os resultados mostraram consistentes com variações abaixo de duas vezes entre os dois métodos. Esses resultados ajudam a consolidar os resultados de RNAseq para expressão de genes relacionados com estresse hídrico, que permitem evidenciar as vias metabólicas relacionadas a esse processo.

**Termos de indexação:** milho, seca, RNASeq, qPCR.

### INTRODUÇÃO

Atualmente, o milho é considerado a terceira maior cultura do mundo, tanto pelo seu valor nutricional quanto por seu valor econômico (Duarte, 2000).

Alterações climáticas, como a seca, acarretam danos na produção desse cereal, principalmente na sincronização dos sistemas reprodutivos, uma vez que o déficit hídrico modifica o intervalo de emergência do pendão até o aparecimento dos estigmas. Na maioria dos casos, plantas sujeitas ao estresse combinam uma série de respostas fisiológicas e bioquímicas em nível molecular, celular em toda a planta (Bohnert et al., 1995; Bray, 1993, 1997; Chaves et al., 2003), que podem levar a alterações na planta que permitam uma maior tolerância a curto e longo prazo ao estresse hídrico. Essas alterações a curto prazo podem variar desde um ajuste osmótico (Morgan, 1984) através do sequestro de íons na planta (Mimura et al, 2003) até um sinal raiz-folha que possa reduzir a transpiração e o crescimento da planta. A longo prazo a planta pode modificar o tamanho e arquitetura do sistema radicular capacitando a planta a absorver maiores quantidades de água durante condições de estresses hídrico. Pouco se conhece sobre os mecanismos regulatórios que traduzem as mudanças ambientais em alterações metabólicas necessárias durante as respostas de adaptação à seca. Um grande número de genes é expresso diferencialmente sob seca em diferentes tecidos, estádios e condições (Reynolds & Tuberosa 2008; Deyholos 2009) e a identificação desses genes responsivos ao déficit hídrico se torna fundamental para o desenvolvimento de linhagens tolerantes, cuja produção possa minimizar os efeitos da seca. Neste trabalho, identificamos alguns desses genes diferencialmente expressos em resposta ao estresse hídrico em milho por RNAseq e a validamos a sua quantificação por qPCR.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Material Genético

Para este trabalho foram utilizados os genótipos de milho identificados como A (tolerante a seca) e B (sensível a seca). Esses genótipos foram caracterizados no Programa de Melhoramento de Milho e Sorgo da Embrapa Milho e Sorgo, tanto em nível de casa de vegetação como em campo. Para esse trabalho, as plantas foram mantidas em casa de vegetação sob condições de 50% e 100% de irrigação por 30 dias entre as fases de pré-florescimento e enchimento do grão. Após esse período, porções das raízes foram coletadas, o excesso de solo foi retirado manualmente e as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido até a extração de RNA. Foram coletadas duas amostras biológicas de duas plantas por cada tratamento.

### Extração de RNA e síntese de cDNA

Antes da extração, cada amostra foi lavada rapidamente em água para retirada do solo residual e macerada em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído utilizando o RNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 1,0 ug de RNA total utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de acordo com as recomendações do fabricante.

### RNASeq

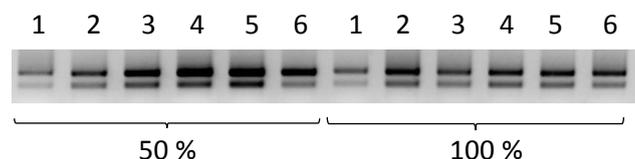
Cerca de 10 ug de RNA total de duas réplicas biológicas de cada tratamento foram enviados para a empresa Eurofins para sequenciamento. As análises de sequências de RNAseq de milho utilizaram o programa TopHat (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>) que alinha sequências do genoma e determina splicing alternativos. O Cufflinks (<http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>) usa o mapa para localizar os transcritos. O Cuffdiff é parte do pacote do Cufflinks que faz o alinhamento de genes em duas ou mais condições determinando genes diferencialmente expressos utilizando análises estatísticas rigorosas. O TopHat e Cufflinks são sistemas baseados em UNIX. Para utilizar uma interface gráfica mais acessível utilizamos a plataforma Galaxy disponibilizado pela Embrapa Informática Agropecuária. O CummeRbund (<http://compbio.mit.edu/cummeRbund/>) produz informações de expressão nos formatos gráficos de vulcano, scatter e boxplots utilizando os dados do Cufflinks e em conexão com o ambiente de estatística R e pode ser acessível pelo Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>). Cem transcritos ou exons únicos de milho (diferencialmente expressos ou não) foram selecionados para validação dos dados obtidos por RNASeq.

### qRT-PCR

A escolha dos transcritos diferencialmente expressos de milho sob condições contrastantes para estresse hídricos (50% Reidratado x 100% Reidratado), das bibliotecas de raiz (B-Root-50 x B-Root-100) foram elencados os transcritos com as maiores expressões diferenciais [ $\log_2$  (Fold Change)] positivas (Up regulation) e negativas (Down regulation), e os transcritos com expressões mais semelhantes (no significant differential expression = NoDiff), excetuando-se os transcritos sem expressão detectada e os transcritos sem teste estatístico. Para as categorias up e down regulated, também foram excluídos os transcritos sem significância estatística da expressão diferencial. Como critério de seleção final, os transcritos sem splicing alternativo (um gene com um único transcrito) foram utilizados para o qRT-PCR. Para aumentar o número de transcritos selecionados, os transcritos que pertenciam a um gene com dois transcritos alternativos foram analisados e somente o(s) exon(s) ou parte(s) do(s) exon(s) do transcrito elencado como diferencialmente expresso, que o diferenciava do outro transcrito foi(ram) utilizado(s) para o qRT-PCR. Os primers foram desenhados para todos os transcritos/exons selecionados utilizando o software PrimerExpress (Applied Biosystems). As reações de PCR em tempo real foram conduzidas em 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando Fast Syber Green Master Mix (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. Um gene que codifica actina foi utilizado como gene de referência para ambos os materiais e quantificação relativa foi calculada utilizando o método  $\Delta\Delta C_t$  (Livak e Schmittgen, 2001).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cerca de 10 ug de RNA total (Figura 1) obtidos de duas réplicas biológicas de cada tratamento foram enviados para a empresa Eurofins para sequenciamento.



**Figura 1:** Análise de integridade das amostras de RNA de milho do genótipo B em gel de agarose 1,2% submetido a 110V por 40 minutos. As análises de sequências de RNAseq de milho feitas na interface gráfica do Galaxy produziram resultados como os apresentados nas Figuras 2A, 2B e 3.

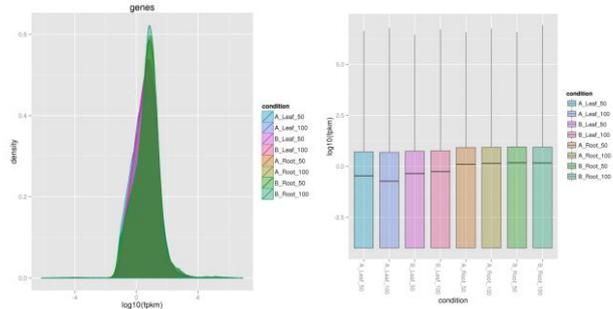


Figura 2 – (A) Distribuição dos escores de FPKM para cada amostra em milho. (B) Boxplots entre amostras. Boxplots de cada amostra para a variação dos seus valores de log (FPKM), que pode ser útil para a observação de tendências entre as amostras. Amostras de raiz A\_Root\_50, A\_Root\_100, B\_Root\_50 e B\_Root\_100 apresentando boxplots muito parecidos.

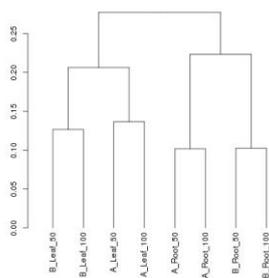


Figura 3 – Dendrograma criado a partir das amostras são úteis para determinar o grau de relacionamento entre as várias amostras. A primeira ramificação do dendrograma agrupou as amostras entre os diferentes tecidos (raiz e folhas). A seguir, ocorreu o agrupamento por genótipo (sensível e resistente). E, por último, ocorreu a separação por tratamento (reposição de 100% ou 50% da água perdida por evapotranspiração).

Dos 100 transcritos/exons selecionados do RNAseq, 79 reações de qPCR apresentaram resultados, 27 para *Down regulated*, 34 para *Up regulated* e 18 para transcritos com diferença de expressão não significativa (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de transcritos diferencialmente expressos com RNAseq selecionados, reações que apresentaram resultados de qPCR e resultados confirmados.

Categoria	RNAseq	qPCR	RNAseq=qPCR
50-100_NoDiff	22	18	16
50-100_Up	49	34	31
50-100_Down	29	27	26

Dos 79 resultados para qPCR, apenas seis resultados não confirmaram os resultados obtidos para RNAseq. Um transcrito relacionado como *Down regulated* no RNAseq apresentou-se *Up regulated* no qPCR; três transcritos *Up regulated* em RNAseq não confirmaram essa condição no qPCR; e dois transcritos *NoDiff* apresentaram alguma diferença para qPCR.

As figuras 4 e 5 mostram a comparação entre os resultados de expressão de qPCR para as bibliotecas B-Root-50 x B-Root-100 de alguns transcritos.

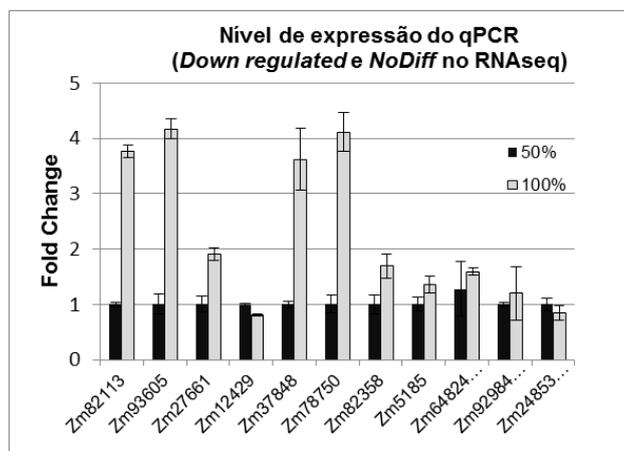


Figura 4: Nível de expressão dos transcritos. *Down-Regulated* em RNAseq: Zm82113, Zm93605, Zm27661, Zm12429, Zm37848, Zm78750, Zm82358 e Zm5185. *NoDiff*: Zm64824, Zm92984, Zm24853. Apenas o transcrito Zm12429 não apresenta resultados compatíveis entre RNAseq e qPCR.

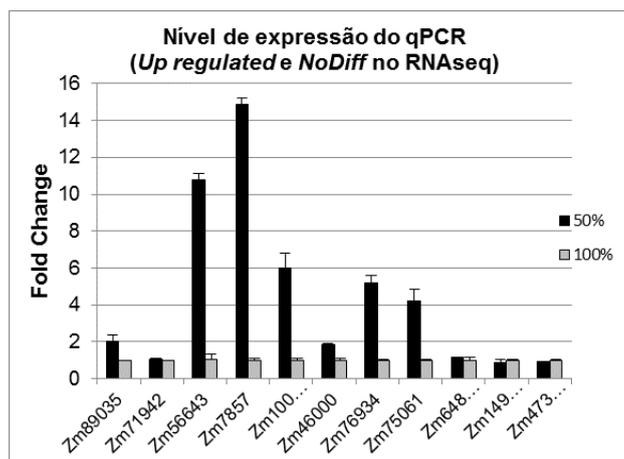


Figura 5: qPCR - Nível de expressão dos transcritos. *Up-Regulated* em RNAseq: Zm89035, Zm71942, Zm56643, Zm7857, Zm100181, Zm46000, Zm76934 e Zm75061. *NoDiff*: Zm64824, Zm14964, Zm47307. Apenas o transcrito Zm71942 não apresenta resultados compatíveis entre RNAseq e qPCR.

A comparação de expressão pelo método de RNAseq e qPCR confirmou os resultados de RNAseq. A grande maioria dos trabalhos publicados mostra a confirmação de resultados de RNAseq por qPCR, evidenciando que há grande coerência entre os dois métodos.

### CONCLUSÕES

A identificação e caracterização de genes relacionados a mecanismos envolvidos no estresse hídrico em milho é de grande importância para o aumento da eficiência nos programas de melhoramento tanto pelo uso de transgênicos como transferência via marcadores moleculares. Contudo, requer extensiva análise de transcriptomas em diferentes situações e genótipos para levantamento de genes candidatos. Comparação de tratamentos entre raiz e parte aérea e sob estresse hídrico por RNAseq e qPCR são bastantes úteis para identificar genes envolvidos nesses processos metabólicos. Nesse trabalho foram comparados resultados obtidos para raiz entre as técnicas de RNAseq e qPCR. A qPCR é uma ferramenta potente para medir expressão genica e é utilizada para confirmar os resultados de RNAseq. qPCR permite ensaios sensíveis e específicos de expressão genica, mas requer caracterização robusta de genes normalizadores. O sequenciamento por RNAseq é um método mais recente de descrição de perfil da expressão genica de vários genes ao mesmo tempo e tem mostrado um avanço de sensibilidade comparado com os microarranjos. Aqui, foi possível confirmar a expressão por qPCR da maioria dos transcritos elencados por RNAseq. A informação do RNAseq além de auxiliar a montagem das redes biológicas relacionadas com o estresse hídrico favorece a identificação de promotores ou regiões regulatórias capazes de ativar genes nessas condições.

### AGRADECIMENTOS

Esse projeto teve a participação da FAPEMIG e Embrapa.

### REFERÊNCIAS

Bohnert, H.J., Nelson, D.E. and Jensen, R.G. (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7, 1099-1111.  
Bray EA (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2:  
Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. 2003. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239–264.

DEYHOLOS, M. K. (2010), Making the most of drought and salinity transcriptomics. *Plant, Cell & Environment*, 33: 648–654.

Livak, J. K., Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method, *Methods* 25 p402-408.

Morgan, J.M. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:299–31.

Reynolds M., Tuberosa R. (2008). Translational research impacting on crop productivity in drought-prone environments. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 171–179 10.1016



## XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

"Milho e Sorgo: inovações,  
mercados e segurança alimentar"

---