

Análise do Transcriptoma de Arroz (*Oryza sativa*) Cultivado Sob Déficit Hídrico

Ricardo Diógenes Dias Silveira^{1,2}, Rosana Pereira Vianello³, Anna Cristina Lanna⁴,
Claudio Brondani⁵, Newton Portilho Carneiro⁶

Resumo

Neste trabalho analisamos a expressão dos genes relacionados à resposta ao déficit hídrico em tecido foliar de duas cultivares brasileiras de arroz de terras altas, a cultivar tolerante Douradão e a cultivar sensível BRS Primavera. Pela análise de RNA-seq foram identificados em Douradão 27.618 transcritos, sendo 24.090 (87,2%) homólogos ao banco de dados de arroz, enquanto que para BRS Primavera dos 27.221 transcritos 23.663 (86,9%) apresentaram homologia no banco de dados. A análise dos genes diferencialmente expressos entre as plantas das duas cultivares, em condições de déficit hídrico, revelou que 2.314 genes tiveram expressão diferenciada (978 induzidos e 1.336 reprimidos em Douradão), desconsiderando os genes comuns. Entre os 978 induzidos em Douradão 324 foram expressos somente nessa cultivar sob déficit hídrico com predomínio dos genes agrupados nas subcategorias enriquecidas *response to stress* (46 genes) e *kinase activity* (34 genes). Através do sequenciamento do transcriptoma de plantas de arroz de terras altas submetidas às condições de déficit hídrico esse estudo possibilitou identificar e caracterizar genes em genótipos contrastantes quanto à tolerância a seca. O grande conjunto de genes identificados são alvos potenciais para serem detalhadamente explorados e validados quanto ao envolvimento na resposta da planta em condições de cultivo com restrição de água.

Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é dos principais alimentos consumidos em todo mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, sendo o alimento básico para mais da metade da população mundial (Huang et al., 2010). O arroz é cultivado sob dois tipos de sistemas, o de várzeas, irrigado por inundação controlada, e o de terras altas cultivado em condições de sequeiro em regime de irrigação (Guimarães et al., 2006). Atualmente, apesar do arroz de terras altas ocupar 55% da área total cultivada, sua produção corresponde a apenas a 25% da produção total brasileira, enquanto em 45% da área total de várzea cultivada são obtidos 75% da produção nacional (Santos and Rabello, 2008). O arroz é sensível às condições de seca principalmente durante a fase reprodutiva, quando até mesmo o estresse moderado pode resultar na redução drástica de produtividade (Hsiao, 1982).

Para transpor as limitações de crescimento e sobrevivência impostas por este fator abiótico as plantas desenvolveram variadas adaptações genéticas, bioquímicas e fisiológicas (Bray, 2005; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozak, 2007) e ao estudar sobre essas respostas muito é aprendido sobre o metabolismo, sua flexibilidade, seus limites e sua diversidade. Diante do estresse, uma variedade de genes é induzida, nas plantas, desencadeando uma complexa rede de respostas que se estende desde a percepção e reconhecimento do sinal de estresse, passando pela ativação de genes de resposta adaptativa até os genes envolvidos na resposta final (Boudsocq and Laurière, 2005).

O presente trabalho objetivou caracterizar em larga escala a expressão diferencial de genes envolvidos na tolerância à seca de duas variedades de arroz de terras altas da subespécie Japonicacontrastantes quanto à tolerância e suscetibilidade ao déficit hídrico, e a anotação da função desses genes por meio da ontologia gênica.

¹ Parte da tese de Doutorado do primeiro autor

² Doutorando do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular – UFG-Goiás. Bolsista da CAPES. e-mail: ricardo_biologia@hotmail.com

³ Pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão – Santo Antônio de Goiás-GO e-mail: rosana.vianello@embrapa.br

⁴ Pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão – Santo Antônio de Goiás-GO e-mail: anna.lanna@embrapa.br

⁵ Pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão – Santo Antônio de Goiás-GO e-mail: claudio.brondani@embrapa.br

⁶ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas – MG e-mail: newton.carneiro@embrapa.br

Material e métodos

Foram utilizadas as cultivares de arroz de terras altas Douradão, tolerante à seca, e Primavera, suscetível ou sensível à seca. Essas cultivares foram escolhidas devido a sua diferença em características fisiológicas (Heinemann et al., 2009), bem como devido à sua utilização como linhagens parentais em programas de melhoramento da Embrapa (Bresghele et al., 2008).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do CNPAF, em novembro de 2010, sob condições ambientais controladas. Foram plantadas sementes dos genótipos em vasos contendo oxissolo, realizando as correções necessárias para adequada condição nutricional da planta de arroz. Foram definidas duas épocas de deficiência hídrica (Estádio Vegetativo V6 e Estádio Reprodutivo R3) e três níveis de estresse 30%, 50% e 70% da Capacidade de Campo (CC) comparados com o tratamento controle (100% da CC). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados com seis repetições por tratamento (regime hídrico), para cada genótipo e para cada época supracitada.

Subsequentemente ao período de restrição hídrica três repetições escolhidas aleatoriamente foram, imediatamente irrigadas e mantidas até o final do ciclo da cultura na CC para avaliação das respectivas produtividades (g grãos vaso⁻¹) em função do regime hídrico imposto. Para definir o tratamento hídrico adequado para que as plantas apresentassem respostas moleculares de tolerância à deficiência hídrica, foi utilizado como balizador um tratamento hídrico que induzisse nas plantas uma redução maior que 50% de produtividade. Os valores das médias entre os tratamentos foram comparados através do teste de Tukey por meio do pacote estatístico ExpDes do software R v.2.13.2 (R Development Core Team, 2010).

Para análise de transcriptoma, amostras de folhas das outras três repetições foram coletadas no último dia de restrição hídrica dos ciclos de deficiência hídrica, mantidas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer (-80° C). Subsequentemente, o RNA total extraído a partir do kit comercial PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies) de acordo com as orientações do fabricante. A avaliação da quantidade e qualidade foi feita no aparelho NanoVue™ (GE Healthcare UK Ltd – England) e BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies CA, USA), respectivamente. A partir dos diferentes genótipos, tratamentos e tecidos vegetais foram desenvolvidas 4 bibliotecas de cDNA, para fins de sequenciamento individual. O sequenciamento RNA-Seq foi realizado na empresa Beijing Genomics Institute (BGI) (Hong Kong, China) utilizando tecnologia Illumina – HiSeq 2000. A estratégia empregada foi a de sequenciamento a partir de ambas as extremidades (paired-end) com fragmentos de 2x100 pb.

As análises de bioinformática foram conduzidas no Laboratório de Bioinformática do Dr. Phillip E. McClean em North Dakota State University, Fargo – Dakota do Norte (Estados Unidos) em ambiente UNIX utilizando várias linhas de comandos. As análises dos genes diferencialmente expressos foram realizadas pelos softwares do pacote Cufflinks. Em seguida foi realizado o BLASTx contra o genoma de arroz (*Oryza sativa*, Nipponbare- MSU Rice Genome versão 7.0) para busca de seqüências homólogas. A partir destas informações foi possível realizar a anotação dos genes pelo termos do Gene Ontology (GO terms) utilizando a base de dados agriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO>) e o software Blast2GO. A caracterização dos genes diferencialmente expressos entre os tratamentos, bem como a avaliação de seus níveis de expressão, foram feitas a partir do cálculo do FPKM (*Fragment Per Kilobase of transcript per Million*) com $FDR < 0.001$ e $|\log_2 \text{ratio}| > 2$.

Resultados e Discussão

A partir das médias de produtividade (Tabela 1) observa-se uma redução mais acentuada de produtividade quando a restrição hídrica foi aplicada na fase reprodutiva (2º ciclo de deficiência hídrica) do que na fase vegetativa (1º ciclo de deficiência hídrica), o que de fato era o esperado, dada a maior possibilidade da planta de arroz se recuperar do déficit hídrico na fase inicial de seu desenvolvimento. Após a definição do ciclo de deficiência hídrica, seguiu-se a seleção do tratamento hídrico que induziu uma redução de produtividade maior que 50%.

Para a cultivar Douradão, a maior diferença entre as médias de produtividades (83,99% de redução) foi observada no tratamento de 30% da CC; enquanto para a Primavera, o tratamento foi o de 50% da CC (Tabela 1). Esses resultados oferecem um bom indicativo da maior tolerância da cultivar Douradão em relação a cultivar BRS Primavera, fornecendo maior confiabilidade da efetividade do ensaio para discriminar os

genótipos com comportamento diferenciado em relação à tolerância à deficiência. Segundo Ferraz (1987), o arroz consome a máxima quantidade de água aproximadamente uma semana antes da floração. Durante todo o ciclo consome 30% na fase vegetativa, 55% na fase reprodutiva e 15% na fase de maturação. Assim, as amostras submetidas ao RNA-Seq foram as folhas de plantas que cresceram em condições de baixa disponibilidade de água na fase reprodutiva, sendo que para as plantas do cultivar Douradão foi necessário uma redução de 70% de água (tratamento de 30% da CC) e para as plantas do cultivar Primavera uma redução de 50% de água (tratamento de 50% da CC).

A análise do transcriptoma por RNA-Seq revelou que o conjunto das quatro bibliotecas gerou 201.509.058 reads paired-ends (PE) de 100 pb. A cobertura total dos reads no genoma do arroz foi de aproximadamente 46 vezes e a cobertura em relação às regiões codantes no DNA (CDS) foi de aproximadamente 200 vezes. A cobertura média no genoma do arroz por biblioteca e a cobertura média nas regiões CDSs foram, respectivamente, 11,65 e 49,81 vezes. Para a cultivar Douradão, dos 27.618 transcritos sequenciados, 24.090 (87,2%) apresentaram similaridade com sequências do banco de dados (MSU Rice Genome version 7.0), enquanto para Primavera essa estimativa foi de 23.663 (86,9%) transcritos. Assim como nossas estimativas Lu et al. (2010) descreve que 83,1% dos transcritos identificados por em seu trabalho foram anotados com *gene models* de arroz.

Somente os genes identificados nas condições de deficiência hídrica (30% da CC da cultivar Douradão com os genes identificados no tratamento 50% da CC da Primavera) foram comparados entre si para fins de identificação dos diferencialmente expressos. Dos 2.519 genes diferencialmente expressos entre os tratamentos controles das duas cultivares 983 eram comuns aos 3.297 genes diferencialmente expressos entre os tratamentos sob déficit hídrico. A partir dessa subtração foram identificados 2.314 genes diferencialmente expressos (978 induzidos e 1.336 reprimidos em Douradão), desconsiderando os genes comuns e deste total 1.171 foram anotados com termos do Gene Ontology (Figura 1) e distribuídos em 26 subcategorias funcionais agrupadas em três grupos principais: Processo Biológico, Função Molecular e Componente Celular. Nesses grupos podemos destacar duas subcategorias enriquecidas: 1) *catalytic activity* (GO:0003824) com 551 genes, dos quais 155 apresentam função de *kinase activity* (GO:0016301), e 2) *response to stimulus* (GO:0050896) com 288 genes, sendo 221 relacionados ao termo *response to stress* (GO:0006950). Entre os 978 induzidos em Douradão 324 foram expressos somente nessa cultivar sob déficit hídrico com predomínio dos genes agrupados nas subcategorias enriquecidas *response to stress* (46 genes) e *kinase activity* (34 genes).

A maioria dos transcritos anotados pela análise de BLAST tiveram similaridade com proteínas disponível no banco de dados de arroz da subespécie *Japonica*. Isto demonstra que a estratégia de sequenciamento paired-end via tecnologia Next-Gen proporcionou a identificação de uma enorme proporção de genes expressos em arroz. Esses transcritos foram assinados com a descrição dos prováveis genes ou nome das proteínas e caracterizados com termos do GO, pois a informação detalhada funcional é essencial para uma compreensão global dos perfis de expressão gênica em arroz. Essas anotações oferecem uma fonte valiosa de investigação de processos específicos, funções e irá contribuir para a identificação de novos genes envolvidos nas vias de sinalização em resposta à seca em arroz.

Tabela 1. Média de produtividade (g grãos vaso⁻¹) e redução de produtividade em plantas de arroz de terras altas, cultivares Douradão e Primavera, submetidas ao cultivo sob condições ótimas de água (tratamento 100%) e sob condições de deficiência hídrica (70, 50 e 30% de água disponível).

Tratamento	Douradão g grãos vaso ⁻¹	Estádio Vegetativo			Estádio Reprodutivo			Redução (%)
		Redução (%)	Primavera g grãos vaso ⁻¹	Redução (%)	Douradão g grãos vaso ⁻¹	Redução (%)	Primavera g grãos vaso ⁻¹	
100%	26,16 ^a	--	16,64 ^a	--	28,54 ^a	--	18,59 ^a	--
70%	23,14 ^{ab}	11,55	11,88 ^a	28,60	25,46 ^a	10,80	16,15 ^{ab}	13,12
50%	20,90 ^{ab}	20,10	11,70 ^a	29,68	18,64 ^a	34,69	8,20 ^b	55,9
30%	14,56 ^b	55,65	3,46 ^b	79,2	4,57 ^b	83,99	0 ^c	100

As letras a e b indicam diferença significativa (Teste de Tukey) entre as médias de produtividade em relação aos tratamentos hídricos de cada genótipo em cada estágio de desenvolvimento. As comparações das médias refere-se aos tratamentos em cada genótipo, ou seja, foram comparadas as médias dentro de cada coluna de dados. A redução de produtividade, em porcentagem, é referente ao decréscimo de produtividade das plantas estressadas comparativamente à produtividade das plantas controle.

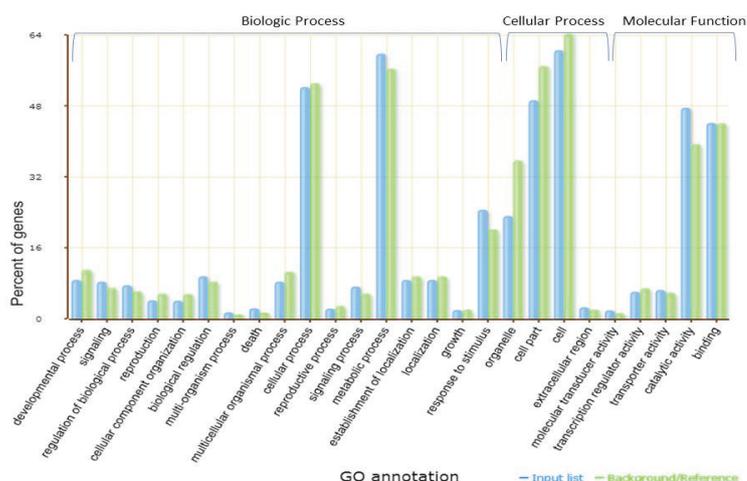


Figura 1. Classificação dos genes diferencialmente expressos entre Douradão e Primavera nos tratamentos sob déficit hídrico (30% da CC em Douradão e 50% em Primavera) pelos termos do Gene Ontology. Os genes estão distribuídos em 26 subcategorias dentro das três categorias funcionais principais: *Biologic Process*, *Cellular Component* e *Molecular Function*.

Apoio

Embrapa Arroz e Feijão e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- Boudsocq M, Laurière C (2005). Osmotic signaling in plants: multiple pathways mediated by emerging kinase families. **Plant Physiol** **138**(3):1185-94.
- Breseghello F et al. (2008). Recent efforts to improve drought resistance of rice in Brazil. In: Serraj R, Bennett J, Hardy B, eds. **Drought frontiers in rice: crop improvement for increased rainfed production**. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines, p. 113-122.
- Bray, EA (1997). Plant responses to water deficit. **Trends Plant Sci** **2**: 48-54.
- Ferraz, EC. Ecofisiologia do arroz In: Castro RC, FERREIRA SO. Ecofisiologia da produção agrícola. Associação Brasileira para pesquisa da Potassa e do Fosfato 1987, p. 185-202.
- Guimarães CM, Santos AB, Magalhães AM, Stone LF (2010). Sistemas de cultivo. In: Santos AB, Stone LF, Vieira NR (ed.). **A cultura do arroz no Brasil**, 2ed., C.3, p. 53-96.
- Hsiao TC (1982). The soil-plant-atmosphere continuum in relation to drought and crop production. In: **Drought resistance in crops, with emphasis on rice**. International Rice Research Institute, 39-52.
- Heinemann AB et al. (2009). Evaluation of physiological traits in upland rice for adaptation to no-tillage system. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 2009; **21**: 113-122.
- Huang JH et al. (2010). Quantitative chemical extraction for arsenic speciation in rice grains. **J Anal At Spectrom**. **25**(6):800–802.
- Lu T et al. (2010). Function annotation of the rice transcriptome at single-nucleotide resolution by RNA-seq. **Genome Res**. **20**(9): 1238–1249.
- Santos AB do, Rabelo RR (2008). **Informações Técnicas para a Cultura do Arroz Irrigado No Estado do Tocantins**. Embrapa Arroz e Feijão, Documentos 218, Santo Antônio de Goiás, p.136.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany** **58** (2): 221–227.