

ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE FOLHAS DE *Prunus persica* SOB ESTRESSE POR ALAGAMENTO USANDO RNA-SEQ

ELSA KUHN KLUMB¹; LETICIA NEUTZLING RICKES¹, LUIS WILLIAN PACHECO ARGE¹, MARCELO NOGUEIRA DO AMARAL¹, ILISANDRA ZANANDREA¹, VALMOR JOÃO BIANCHI²

¹ Universidade Federal de Pelotas – elsakk91@yahoo.com.br

² Instituto de Biologia - Universidade Federal de Pelotas - valmorjb@yahoo.com

1. INTRODUÇÃO

O pessegueiro [*Prunus persica* (L) Batch] é uma das frutíferas mais cultivadas no mundo. No Brasil, o pêssego é produzido predominantemente nos Estados do Sul, onde as condições climatológicas favorecem a sua exploração comercial (EMBRAPA, 2005). O Estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor nacional, com cerca de 132.736 toneladas, em 13.514 hectares de área cultivada no ano de 2012 (IBGE, 2012), porém a produtividade média dos pomares ainda é baixa ($\approx 9 \text{ t ha}^{-1}$), fato atribuído principalmente pela carência de estudos sobre as respostas dos portaenxertos sob condições de estresse biótico e abiótico.

No Brasil, a produção de portaenxertos de pessegueiro se dá, na grande maioria dos casos, através do uso de caroços obtidos nas agroindústrias de conservas. Esse tipo de material não possui controle de qualidade genética e sanitária, influenciando negativamente a produção e a produtividade de frutas de caroço (FACHINELLO; BIANCHI, 2005). Somado a isso, na região Sul do Rio Grande do Sul, muitas áreas cultivadas com *Prunus* spp. possuem problemas de drenagem e podem permanecer alagadas durante algum período do ciclo da cultura por excesso de chuvas, em períodos críticos como o florescimento e início da brotação, causando estresse por hipoxia, podendo levar plantas a morte. Portanto, o estudo e entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no estresse por hipoxia/anoxia em *Prunus* poderá auxiliar sobremaneira os trabalhos de melhoramento de portaenxertos, visando obter genótipos mais tolerantes e diminuir os efeitos deste estresse.

Atualmente, com as novas tecnologias de sequenciamento NGS (*Next Generation Sequencing*) aumentou exponencialmente os genomas sequenciados. Além da aplicação na genômica, o NGS tem sido aplicado também no sequenciamento massivo de transcriptomas (RNA-seq), permitindo uma análise global de todos os genes com expressão induzida ou reprimida sob determinadas condições experimentais, incluindo a identificação de splicing alternativo. Assim, a análise de RNA-seq vem se consolidando como método padrão para identificar genes associados a características de interesse, pois esta abordagem de análise não se limita a detecção de transcritos que correspondam a sequências genômicas preexistentes, possibilitando o estudo de qualquer tipo de genoma e uma ampla gama de características (WANG et al., 2009). O uso desta estratégia de análise abriu a possibilidade de gerar grande quantidade de dados de forma rápida, com grande aplicabilidade em auxílio aos programas de melhoramento genético, especialmente de plantas lenhosas.

Portanto, neste trabalho se utilizou a tecnologia de RNA-seq com objetivo de identificar genes diferencialmente expressos em folhas de plantas do portaenxerto de pessegueiro 'Capdeboscq' submetidos a estresse por alagamento.

2. METODOLOGIA

Plantas de pessegueiro ‘Capdeboscq’ com 10 meses de idade, propagadas por estaquia e plantadas em vasos de 5L, foram mantidas em casa de vegetação com temperatura controlada ($28\pm 4^{\circ}\text{C}$) e submetidas ao estresse por alagamento. Folhas jovens e completamente expandidas foram coletadas aos dois dias de estresse e armazenadas imediatamente em ultrafreezer.

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de folhas utilizando o kit de extração Plant RNA Reagent Purelink®. As bibliotecas foram preparadas por meio do TruSeq RNA Sample Preparation kit v2 (Illumina), e a qualidade das bibliotecas avaliadas com o equipamento Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies) usando o kit Agilent DNA 1000 (Agilent). O sequenciamento das bibliotecas foi do tipo paired-end 2x100 reads, realizado na plataforma HiSeq 2500 (Illumina).

A análise de qualidade das bases dos reads, de cada biblioteca, foi realizada no software FastQC. Após, o software Trimmomatic (BOLGER et al., 2014) foi utilizado para a remoção tanto das bases com baixa qualidade como dos possíveis adaptadores presentes nas bibliotecas.

O mapeamento dos reads com o genoma de referência (*Prunus persica*) foi realizado com o software TopHat Ver. 2.0.11 (TRAPNELL et al., 2009). Após o mapeamento dos reads foi realizado o *assembling* dos reads mapeados para obtenção de fragmentos com o software Cufflinks Ver. 2.1.1 (TRAPNELL et al., 2010). Os arquivos oriundos do Cufflinks foram usados para obtenção de um transcriptoma único, seguindo da análise de identificação dos genes diferencialmente expressos pelo Cuffdiff e CummeRbund (GOFF et al., 2012). Os genes diferencialmente expressos (DEGs) foram identificados com valor de *p-value* inferior a 0,01 pelo teste exato de Fisher. Os DEGs foram usados para a análise de anotação gênica pelo software Blast2GO (CONESA et al., 2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta análise do transcriptoma de folhas do pessegueiro ‘Capdeboscq’ revelou 2.964 GDE ($p < 0.01$), sendo 1.553 regulados positivamente (up-regulated) e 1.410 regulados negativamente (down-regulated). Dentre os 2.964 GDE, 1.905 foram anotados funcionalmente através da ferramenta Blast2GO, sendo 962 up-regulated e 943 down-regulated.

A visualização geral dos resultados de anotação gênica foi realizada em três classes ontológicas: processos biológicos, componentes celulares e função molecular (figura 1), ao nível 2 de estrutura hierárquica.

Para processos biológicos (Figura 1A) os termos GO (Gene Ontology) foram anotados em 16 categorias, sendo que a maioria dos termos estão relacionados a processos metabólicos (19%), seguido de processos celulares (18%), resposta a estímulos (11%) e processos singulares de organismos (11%). Em relação aos componentes celulares (Figura 1B), os termos GO anotados foram em seis categorias, sendo a maioria para a célula (âmbito geral - 44%), seguido de 35% nas organelas e 10% nas membranas. Quanto a função molecular (Figura 1C) obteve-se oito categorias, onde majoritariamente estavam referenciadas a atividade catalítica (57%), seguido de ligação (22%) e associadas à transporte (10%). Resultados similares foram encontrados por vários autores (RABELLO et al., 2008; ZHANG et al., 2013; BOWMAN et al., 2013), nos quais as mesmas categorias de genes diferencialmente expressos obtiveram destaque

para as três classes ontológicas estudadas quando expostas a estresse abiótico em arroz e algodão.

Frente aos resultados pode-se observar que o estresse por alagamento induziu a expressão de vários genes associados com o metabolismo do amido e da sacarose, os quais obtiveram uma regulação positiva (up-regulated). O mesmo pode ser comprovado em estudos com arroz (RABELLO et al., 2008) e algodão (BOWMAN et al., 2013), sendo que o aumento no metabolismo de carboidratos e da concentração de outros osmólitos auxiliam na manutenção do potencial osmótico da célula (PARK et al., 2012; BOWMAN et al., 2013).

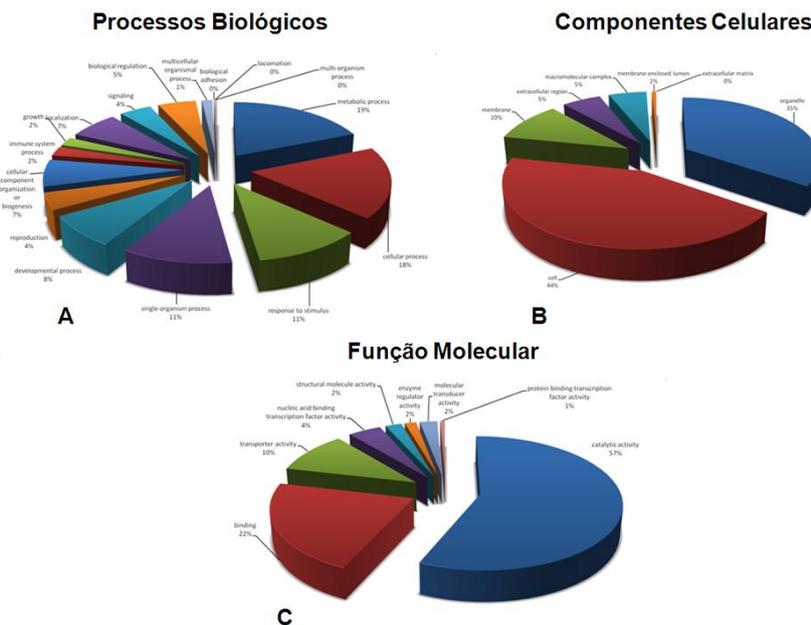


Figura 1. Classificação ontológica de genes diferencialmente expressos em folhas de pessegueiro 'Capdeboscq' (*Prunus persica*) sob 48 horas de estresse por alagamento: A- Processos biológicos, B- Componentes celulares, C- Função molecular.

Em relação aos parâmetros fotossintéticos, verificou-se uma regulação negativa (down-regulated) de genes envolvidos em complexos de captação de luz e de subunidades polipeptídicas pertencentes aos fotossistemas I e II, corroborando com o que foi encontrado em pessegueiro (*Prunus persica*) quando exposto a estresse biótico (SOCQUET-JUGLARD et al., 2013). Postula-se que a regulação negativa de genes envolvidos na fotossíntese em situações estressantes seja para a proteção do aparelho fotossintético contra danos oxidativos (NIYOGI, 2000).

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho contribui para a elucidação do perfil transcricional e principais vias metabólicas em *Prunus persica* envolvidas no estresse por alagamento e possibilitou a anotação funcional de inúmeros genes diferencialmente expressos pela análise de ontologia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOWMAN, M. J.; PARK, W.; BAUER, P. J.; UDALL, J. A.; PAGE, J. T.; RANEY, J.; SCHEFFLER, B. E.; JONES, D. C.; CAMPBELL, T. RNA-Seq Transcriptome Profiling of Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Root Tissue under Water-Deficit Stress. **PLoS ONE**, São Francisco, v.8, n.12, p. e82634, 2013.
- CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, Oxford, v.21, p.3674-3676, 2005.
- EMBRAPA Clima Temperado. **O Cultivo do Pêssego**. Sistemas de Produção, 4. ISSN 1806-9207. Versão Eletrônica, 2005.
- FACHINELLO, J. C.; BIANCHI, V. J. 2005. **Porta-enxertos para frutas de caroço: banco ativo de germoplasma (BAG) e atividades de pesquisa na UFPel**. In: Simpósio Brasileiro de Recursos Genéticos, 2005, Pelotas. Resumos e Palestras. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. v. 1. p. 103-107.
- GOFF, L.; TRAPNELL, C.; KELLEY, D. CummeRbund: Analysis, exploration, manipulation, and visualization of Cufflinks high-throughput sequencing data. **R package version 2.6.1**. 2012.
- IBGE. **Banco de dados**. Acessado em 09 jul. 2014. Online. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?z=t&o=11&i=P>
- LANGMEAD, Ben; SALZBERG, Steven L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, Londres, v.9, n 4, p.357-359, 2012.
- NIYOGI, K. K. Safety valves for photosynthesis. **Plant Biology**, Stuttgart, v.3, n.1, p.455–460, 2000.
- PARK, W.; SCHEFFLER, B. E.; BAUER, P. J.; CAMPBELL, B. T. Genome-wide identification of differentially expressed genes under water deficit stress in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **BMC Plant Biology**, Londres, v.12, n.90, p.1-12, 2012.
- RABELLO, A. R.; GUIMARÃES, C. M.; RANGEL, P. H. N.; SILVA, F. R.; SEIXAS, D. Identification of drought-responsive genes in roots of upland rice (*Oryza sativa* L.). **BMC Genomics**, Londres, v.9, n.485, p. 1-13, 2008.
- SOCQUET-JUGLARD, D.; KAMBER, T.; POTHIER, J. I. F.; CHRISTEN, D.; GESSLER, C.; DUFFY, B.; PATOCCHI, A. Comparative RNA-Seq Analysis of Early-Infected Peach Leaves by the Invasive Phytopathogen *Xanthomonas arboricola* pv. Pruni. **PLoS ONE**, São Francisco, v.8, n.1, e54196, 2013.
- TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, STEVEN, L. TopHat: discovering Splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, Oxford, v.25, n.9, p.1105-1111, 2009.
- TRAPNELL, C.; WILLIAMS, B.A.; PERTEA, G.; MORTAZAVI, A.M.; KWAN, G.; VAN BAREN, M.J.; SALZBERG, S.L.; WOLD, B.; PACHTER, L. Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. **Nature Biotechnology**, Nova York, v.28, n.5, p.511–515, 2010.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, Londres, v.10, n.1, p.57–63, 2009.
- ZHANG, X.; YAO, D.; WANG, Q.; XU, W.; WEI, Q. mRNA-seq Analysis of the *Gossypium arboreum* transcriptome Reveals Tissue Selective Signaling in Response to Water Stress during Seedling Stage. **PLoS ONE**, São Francisco, v.8, n.1, e54762, 2013.