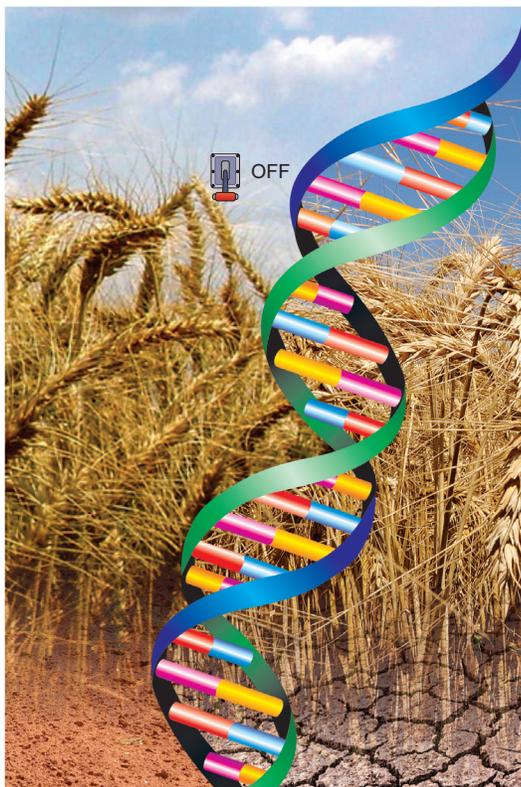


Estudo de Expressão Gênica para a Seleção de Genótipos de Trigo Contrastante na Resposta à Seca



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
387**

Estudo de Expressão Gênica para a Seleção de
Genótipos de Trigo Contrastante na Resposta à Seca

*Maria Cristina Rocha Cordeiro
Walter Quadros Ribeiro Jr
Marco Aurélio Pessoa Filho
Rodrigo da Rocha Fragoso
Marília Santos Silva*

Exemplar desta publicação disponível gratuitamente no link: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/?initQuery=t>

Embrapa Cerrados
BR 020, Km 18, Rod. Brasília / Fortaleza
Caixa Postal 08223
CEP 73310-970, Planaltina, DF
Fone: (61) 3388-9898
embrapa.br/cerrados
embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações da Unidade

Presidente
Lineu Neiva Rodrigues

Secretária-executiva
Alessandra Duarte de Oliveira

Secretária
Alessandra Silva Gelape Faleiro

Membros
Alessandra Silva Gelape Faleiro; Alexandre Specht; Edson Eyji Sano; Fábio Gelape Faleiro; Gustavo José Braga; Jussara Flores de Oliveira Arbues; Kleberon Worsley Souza; Maria Madalena Rinaldi; Shirley da Luz Soares Araujo

Supervisão editorial
Jussara Flores de Oliveira Arbues

Revisão de texto
Jussara Flores de Oliveira Arbues
Margit Bergener Leite Guimarães

Normalização bibliográfica
Shirley da Luz Soares Araújo

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Wellington Cavalcanti/Renato Berlim Fonseca

Foto da capa
Fabiano Bastos

1ª edição
1ª impressão (2021): tiragem 30 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Cerrados

E82 Estudo de Expressão gênica para a seleção de genótipos de trigo contrastante na resposta à seca / Maria Cristina Rocha Cordeiro ... [et al.]. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2021.

34 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Cerrados, ISSN 1676-918X, ISSN on-line 2176-509X, 387).

1. Seleção fenotípica. 2. Seca. 3. Mudança climática. I. Cordeiro, Maria Cristina. II. Embrapa Cerrados. III. Série.

CDD (21 ed.) 633.11

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	14
Conclusões.....	31
Referências	32

Estudo de Expressão Gênica para a Seleção de Genótipos de Trigo Contrastante na Resposta à Seca

Maria Cristina Rocha Cordeiro¹; Walter Quadros Ribeiro Jr²; Marco Aurélio Pessoa Filho³; Rodrigo da Rocha Fragoso⁴; Marília Santos Silva⁵

Resumo – A seca é uma ameaça mundial à produção de alimentos e pode resultar em grandes perdas de produtividade agrícola e, em especial, dos cultivos de cereais como o trigo. A seleção de cultivares de trigo tolerantes à seca é muito importante para que as perdas de produtividade advindas das mudanças climáticas sejam mitigadas. A região do Cerrado brasileiro é uma savana tropical situada no interior do País, e representa uma área considerada como uma fronteira agrícola de produção de alimentos e cereais, como o trigo. Nessa região, o trigo pode ser plantado no inverno com irrigação (de abril/maio a agosto/setembro) e, alternativamente, na safrinha, em cultivo de sequeiro (de fevereiro a maio) e, por isso, a seleção de genótipos tolerantes à seca é muito importante. Este trabalho teve por objetivo estudar a expressão gênica em genótipos contrastantes de trigo para compreender o complexo sistema fisiológico-genético de tolerância à seca nessa cultura agrícola, auxiliando na seleção dos melhores genótipos que possam superar os efeitos das mudanças climáticas. Duas abordagens foram envolvidas: (a) análises em bibliotecas subtrativas de cDNA e (b) sequenciamento de transcriptoma pela plataforma 454 GS FLX (Roche). Os potenciais genes expressos estão relacionados com atividades de expressão e regulação gênica, ligação de fatores de transcrição (FT) em ácidos nucleicos ou proteínas à FT, atividade catalíticas ou de regulação enzimática, proteínas receptoras e transportadoras ou com o sistema de oxidorredução. Este trabalho representa os primeiros resultados de expressão gênica em genótipos com respostas contrastantes à seca na Embrapa Cerrados.

Termos para indexação: fenotipagem; campo; cera; sequenciamento; mudanças climáticas; seca.

¹ Bióloga, doutora em Ciências (Biologia Molecular), pesquisadora da Embrapa Cerrados Planaltina, DF

² Biólogo, Ph.D. of Philosophy, pesquisador da Embrapa Cerrados Planaltina, DF

³ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Cerrados Planaltina, DF

⁴ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Cerrados Planaltina, DF

⁵ Engenheira-agrônoma, doutora em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília DF

Gene Expression in Contrasting Wheat Genotypes in Response to Drought

Abstract – Drought is a global threat to food production and can result in large losses in agricultural productivity and, in particular, in cereal crops such as wheat. The selection of drought-tolerant wheat cultivars is very important so that yield losses resulting from climate change are mitigated. The Brazilian Cerrado region is a tropical savanna located in the interior of the country and represents an area considered as an agricultural frontier of food production including cereals such as wheat. In this region, wheat can be planted in winter with irrigation (from April/May to August/September) and, alternatively, in off-season, in rainfed cultivation (from February to May) and, therefore, the selection of drought-tolerant genotypes is very important. In order to select common genotypes and mitigate the impacts of climate change in this region on agricultural productivity, phenotyping methodologies associated with molecular methodologies are carried out in order to understand the complex physiological-genetic system of drought tolerance in this crop as a way to assist in the selection of the best genotypes for this region, so that they can overcome the effects of climate change. The study of gene expression in this work involved two approaches: (a) analyzes in subtractive cDNA libraries and (b) transcriptome sequencing using the 454 GS FLX platform (Roche). The potential expressed genes are related to gene expression and regulation activities, binding of transcription factors (TF) in nucleic acids or proteins to TF, catalytic or enzymatic regulation activities, receptor and transport proteins or related to the oxide-reduction system. This work represents the first results in gene expression analysis in contrasting genotypes to drought response at Embrapa Cerrados.

Index terms: phenotyping; field; wax; sequencing; climate change; drought.

Introdução

A seca é uma ameaça mundial à produção de alimentos e pode ser mais drástica devido às mudanças climáticas. Pode resultar em grandes perdas de produtividade agrícola e, em especial, dos cultivos de cereais como o trigo, que é largamente utilizado como alimento sendo uma das maiores fontes de energia no mundo todo (Sallam et al., 2019). Portanto, a seleção de cultivares de trigo tolerantes à seca é muito importante para que, as perdas de produtividade advindas das mudanças climáticas sejam mitigadas (Khan et al., 2019).

A seleção de genótipos tolerantes à seca envolve um estudo multidisciplinar e integrado com as ferramentas de análises morfológicas, fisiológicas e as modernas de análises genéticas como a genômica, a transcriptômica, a proteômica, além da utilização de sensores fotoelétricos entre outras metodologias, para que se possa alcançar mais êxito e velocidade na seleção dos melhores genótipos. Adicionalmente, essas ferramentas auxiliam na identificação dos principais mecanismos genéticos das plantas associados à tolerância à seca, que nos apontam caminhos para a geração de genótipos superiores mais tolerantes (Mosa et al., 2010). Um desses mecanismos que as plantas possuem e permitem maior tolerância à seca é a produção de cera cuticular (Bl et al., 2017; Xue et al., 2017; Patwari et al., 2019).

A tolerância à seca em plantas é uma característica que pode ser associada a outros estresses, como calor, salinidade, doenças e pragas, resultando em um sistema fisiológico-genético bastante complexo para se pontuar os mecanismos principais envolvidos. Representa uma herança poligênica, que envolve a integração de mais de um mecanismo fisiológico como a fotossíntese e o metabolismo (Marcek et al., 2019; Sallam et al., 2019), além dos processos de resposta de defesa em função da homeostase do sistema nessa situação.

O trigo tem uma estrutura genômica complexa sendo uma planta hexaploide. Em nível genético, a tolerância à seca, por ser uma herança multigênica, envolve diferentes traços de loci quantitativos (QTLs) (Qassem et al., 2018).

Atualmente, já foi obtida a sequência genômica completa do trigo (Guan et al., 2020; Walkowiak et al., 2020), permitindo o avanço de estudos multidisciplinares integrados, pois essa sequência possibilita o isolamento de novos

marcadores genéticos (Microsatélites, SNPs, KASPs); a revisão e a correção de mapas genéticos já estabelecidos; a seleção de genes ainda não conhecidos nos diferentes processos fisiológicos-genéticos; as análises de sintonia entre cultivares homólogas, como o arroz e outros cereais.

A região do Cerrado brasileiro é uma área de savana tropical com um clima típico, contendo uma estação chuvosa (de outubro a abril) e, outra, seca (de maio a setembro) (Figura 1). Consideráveis avanços da agricultura foram alcançados nessa região, que tem sido apontada como uma fronteira agrícola de produção de alimentos, em especial, cereais e grãos (soja, milho, sorgo, arroz, feijão, trigo, mas, também, algodão, cana-de-açúcar, café, fruta etc.) (Albuquerque; Silva, 2008). Nessa região, o trigo pode ser plantado no inverno com irrigação (de abril/maio a setembro) e, alternativamente, na safrinha, em cultivo de sequeiro (de fevereiro a maio), no final da estação chuvosa e, por isso, a seleção de genótipos tolerantes à seca é muito importante (Ribeiro Júnior et al., 2006). Com o objetivo de selecionar genótipos que enfrentem os veranicos comuns na safrinha e de mitigar os impactos nas mudanças climáticas e na produtividade agrícola, metodologias de fenotipagem têm sido estudadas de forma a selecionar cultivares mais tolerantes à seca para essa região.

Este trabalho teve por objetivo estudar a expressão gênica em genótipos contrastantes de trigo, de forma a compreender o complexo sistema fisiológico-genético de tolerância à seca nesta cultura agrícola, auxiliando e integrando na seleção de possíveis genes marcadores para os processos de fenotipagem das plantas elite em campo, em regime de irrigação em gradiente relacionados a aspectos morfológicos e fisiológicos.

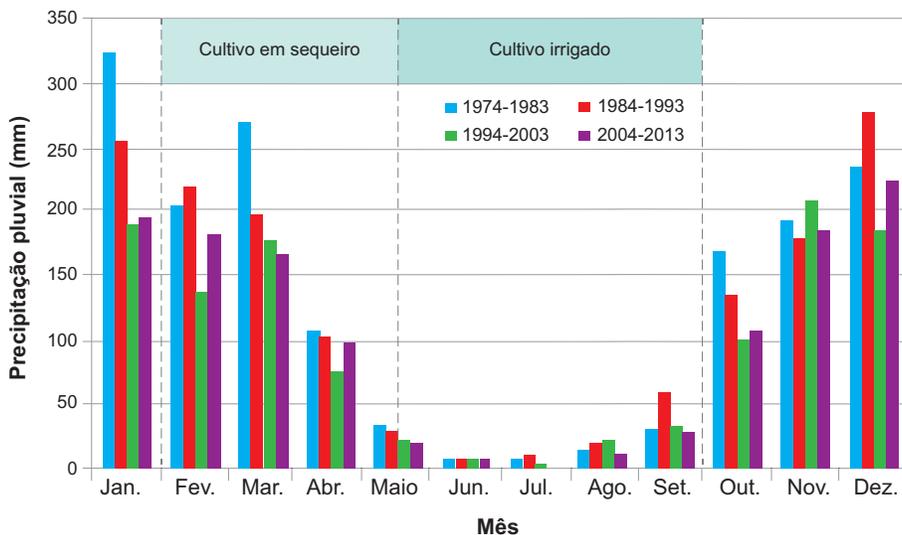


Figura 1. Precipitação pluviométrica média mensal observados na Estação Principal da Embrapa Cerrados, localizada na região administrativa de Planaltina, DF, no período histórico de 1974 a 2013, que demonstra que esta região se caracteriza por duas estações: uma chuvosa de outubro a abril e, outra seca de maio a setembro e os tipos de cultivo do trigo na região são: cultivo em sequeiro/safrinha (fevereiro a maio) e cultivo irrigado (maio a setembro).

Fonte: (Silva et al., 2017).

Material e Métodos

O experimento foi conduzido entre maio a setembro de 2011, na área experimental da Embrapa Cerrados, localizada em Planaltina, DF cujas coordenadas geográficas são 15°35'30" S e 47°42'30" W e altitude de mil metros. Os dados climatológicos (precipitação pluviométrica, umidade relativa e temperatura) podem ser observados na Figura 2. O clima predominante na região é do tipo Aw, típico das savanas com duas estações bem definidas: uma seca e fria (outono e inverno – abril/maio a agosto/setembro) e outra quente e úmida (primavera e verão – setembro a março), segundo a classificação de Köppen.

O solo da área foi classificado como Latossolo Vermelho, distrófico, com textura argilosa (Santos et al., 2018). A composição química do solo da área do experimento continha 0,9 cmol/dm³ de cálcio; 0,6 cmol/dm³ de magnésio; 0,05 cmol/dm³ de potássio; 0,2 cmol/dm³ de alumínio; 0,5 cmol/dm³

de fósforo; 32,5 g/dm³ de matéria orgânica (MO); 200 g/kg⁻¹ de areia, 275 g/kg⁻¹ de silte, 525 g/kg⁻¹ de argila e pH 5,6. Anteriormente à instalação do experimento, a área foi cultivada com trigo por 6 anos com as mesmas cultivares testadas no presente estudo. A adubação do plantio foi feita com 400 kg de 4:30:16, com 80 kg de N em cobertura no perfilhamento na forma de ureia. O herbicida pré-emergente foi Pendimentalin, na dosagem de 3 L/ha e pós-emergente metsulforam metílico, na dosagem de 4 g/ha, além de aplicação de um fungicida preventivo Estrobirulina+Triazol, na dosagem de 1 L/ha. Foi utilizado também redutor de crescimento trinexapac etílico para evitar acamamento na dosagem de 0,5 L/ha do produto. A semeadura dos genótipos de trigo nas parcelas foi realizada com o auxílio de semeadora de parcelas experimentais do modelo Semeato, de tração tratorizada, com oito linhas espaçadas por 0,17 m. A quantidade de semente foi calculada para obter um estande de 90 plantas por metro, sendo esta corrigida em função do teste de germinação previamente realizado. A colheita do experimento foi mecanizada e as parcelas foram pesadas e corrigidas para a umidade de 13%. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em esquema de parcelas subdivididas, com três repetições. As parcelas corresponderam aos genótipos de trigo BRS020062 e PF020037, que apresentam níveis contrastantes de cerosidade foliar que foi observado de forma bem evidente visualmente e documentado em fotos (Ribeiro Júnior et al., 2006). Foram utilizadas parcelas subdivididas, sendo estas correspondentes aos genótipos e as subparcelas, aos regimes hídricos. A irrigação inicial foi feita de forma homogênea em todos os genótipos até aos 30 dias após a emergência, que corresponde ao perfilhamento. As lâminas utilizadas foram calculadas de acordo com o programa de Monitoramento da Irrigação no Cerrado⁶, que considera os dados climáticos da região, a evapotranspiração da cultura e o turno de rega para calcular a quantidade de água necessária. Após esse período de estabelecimento da cultura, adaptou-se a metodologia do line source (Hanks et al., 1976). A sobreposição entre os diferentes aspersores promoveu uma diminuição gradiente de água da área central (considerada lâmina ideal) para a extremidade do experimento, o que permitiu criar os regimes hídricos. O material foliar (três folhas) foi coletado dos genótipos PF020037 e BRS020062, respectivamente, que são linhas irmãs, com e sem produção de cerosidade foliar, portanto, genótipos contrastantes para essa característica (que é consi-

⁶ <http://hidro.cpac.embrapa.br/help.html>

derado um mecanismo de tolerância à seca) em ponto referente à planta com 100% e 50% de água, nas fases fenológicas de espigamento (escala Zadoks 4.9) e enchimento de grãos na escala Zadoks 7.5 (Figuras 2, 3 e 4). Segundo a adaptação da escala de Zadoks da Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO) para o trigo⁷, o ponto 4.9 corresponde ao final da fase de bainha engrossada para a fase espigado, portanto, quase no início da fase espigado e, o ponto 7.5 como sendo no meio da fase do estado leitoso do grão, portanto, início da fase de enchimento de grãos. Neste trabalho, para simplificar, será referenciado como espigamento (escala de Zadoks 4.9) e enchimento de grãos (escala de Zadoks 7.5) (Zadoks et al., 1974).

As folhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas congeladas à -80 °C até sua utilização. O RNA (ácido ribonucleico) foi extraído das folhas coletadas nos pontos com e sem estresse das linhagens PF020037 e BRS020062 nas fases de espigamento e enchimento de grãos com o reagente *Concert* (Invitrogene) seguindo as instruções do fabricante. O material da fase de espigamento também foi purificado na coluna do *PureLink RNA Mini Kit* (Ambion). Após sua extração, o RNA foi quantificado em espectrofotômetro do tipo Nanodrop ND2000 e observado em eletroforese de gel a 1,5% de agarose. Tendo sido considerado íntegro, o material foi utilizado nas etapas posteriores de purificação do RNA mensageiro poliA+ e construção das bibliotecas subtrativas de cDNA (Figura 6). O RNA poliA+ foi purificado utilizando-se o kit Oligotex mRNA Midi seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação, o RNA poli A+ foi quantificado em espectrofotômetro do tipo Nanodrop ND2000 e observado em eletroforese de gel a 1,5% de agarose. Sendo considerado íntegro, foi utilizado na construção das bibliotecas de cDNA. Duas bibliotecas subtrativas de cDNA foram construídas utilizando-se o kit PCR-Select cDNA Subtraction, seguindo as instruções do fabricante: uma, tomando-se como *tester* o RNA poliA+ do genótipo PF020037 sob estresse hídrico na fase de enchimento de grãos e *driver* o RNA poliA+ do genótipo PF020037 sem estresse hídrico na mesma fase; e outra, tomando-se como *tester* o RNA poliA+ do genótipo BRS020062 sob estresse hídrico na fase de enchimento de grãos e *driver* o RNA poliA+ do genótipo BRS020062 sem estresse hídrico na mesma fase. Os cDNAs resultantes da subtração de cada uma das bibliotecas foram clonados em vetor do tipo *PGemTeasy*

⁷ <https://pt.scribd.com/document/319732725/Escala-Zadoks-Trigo#logout>

e transformados por eletroporação em células de *Escherichia coli* (*E. coli*) competentes do tipo XL1blue. Os clones obtidos foram crescidos em meio LB líquido, congelados e mantidos a -80 °C em glicerol e enviados em placa de meio Luria Bertani (LB) sólido para posterior minipreparação e sequenciamento na empresa MacroGen Inc. (Seoul, Coréia).

O serviço de minipreparação para o sequenciamento foi realizado automaticamente por meio de robôs em procedimento próprio da empresa MacroGen, assim como, o sequenciamento, utilizando um sequenciador modelo 3730XL DNA analyzer (AB, USA) e o kit BigDye v3.1 (AB, USA). Foram sequenciados os 576 clones resultantes referentes à biblioteca subtrativa da variedade cerosa e os 44 clones resultantes referentes à variedade não cerosa. As análises de bioinformática das sequências obtidas do sequenciamento dos clones das bibliotecas subtrativas foram realizadas segundo o seguinte protocolo: (1) os eletroferogramas foram lidos e as sequências convertidas em formato Fasta; (2) as sequências de maior qualidade (qualidade mínima de phred > 20) foram analisadas e processadas utilizando as ferramentas de bioinformática como *Lucy DNA sequence quality and vector trimming tool – SeqCleanLucy*⁸, *Cross_match* e *RepeatMasker*, sendo as sequências de má qualidade, de vetores ou repetitivas removidas; (3) caudas poli-A/T encontradas nas sequências foram recortadas para um tamanho mínimo de oito pares de base (pb); (4) sequências menores que 100 pb foram descartadas, assim como sequências compostas somente por repetições microssatélite; (5) o agrupamento foi feito utilizando-se a ferramenta de bioinformática *TGICL clustering tool*; (6) as sequências agrupadas foram submetidas à análise de similaridade, utilizando a ferramenta de bioinformática *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* no modo *BLASTX* contra os bancos de dados não redundante (*nr*), *Eukaryotic Orthologous Groups of Proteins (KOG)*, e *Swiss-Prot Protein Sequence Databank*; (7) a anotação foi finalizada utilizando a Plataforma de bioinformática *Blast2GO – Functional Annotation and Genomics* (<https://www.blast2go.com/>), em que foi realizada as seguintes análises: (a) mapeamento de termos de ontologia gênica (GO); (b) busca por domínios conservados via *InterProScan*; e (c) por códigos EC (*enzyme codes*); (8) as anotações foram alteradas manualmente, quando necessário; (9) os gráficos de dispersão de termos GO, de espécies com os hits mais significativos na análise *BLASTX* e

⁸ <http://sourceforge.net/projects/seqclean/>
<http://lucy.sourceforge.net/>

sumários do processo de anotação também foram gerados com o programa *blast2go*.

As amostras analisadas em RNA-seq foram as mesmas extraídas como anteriormente, referentes aos genótipos selecionados com e sem cerosidade (62M (EG), 62N (EG), 37E (EG), 37N (EG), 37E (ES) e 37N (ES) nas fases fenológicas de espigamento (ES) e enchimento de grãos (EG).

Antes do sequenciamento, as amostras de RNA enviado à MacroGen foram analisadas em *Bioanalyzer* (Agilent) para verificação de qualidade na própria empresa MacroGen. O sequenciamento de RNA-seq e posterior montagem e análises de bioinformática foram realizadas no serviço terceirizado da empresa MacroGen da Korea utilizando o programa GS FLX (versão 2.6) (Roche), seguindo as seguintes etapas:

Etapa 1 – para todas as amostras analisadas: as sequências geradas utilizando a plataforma 454 GS FLX (Roche) foram processadas e niveladas com o mesmo *background* e foram corrigidos erros de imagem e sinal e, também, as sequências relacionadas com primer e/ou sequências de má qualidade foram removidas.

Etapa 2 – em cada biblioteca/amostra, o sequenciamento gerou sequências que variaram de tamanho de <50 pb a ~600 pb aproximadamente, com predominância de sequências de 400 pb a 600 pb. As sequências foram alinhadas pelo programa GS De novo Assembler (versão 2.6). O alinhamento constituiu uma hierarquia de sequências agrupadas da seguinte forma: Isogrups > Isotigs > Contigs, que representam o resultado da sobreposição no alinhamento entre as sequências geradas. Os agrupamentos são devidos a variantes de processamento de RNA mensageiro (RNAm) e, havendo RNA ainda não processado nas amostras, alguns contigs também podem estar relacionados com sequências de Intron ou terminais 5'; 3'. A opção no programa foi cDNA. Os parâmetros foram: *seed step* (12 pb); *seed length* (16 pb); *seed count* (1) (referentes às melhores sequências raw); *minimum overlap length* (40); *minimum overlap identity* (90); *alignment identity score* (2); *alignment difference score* (-3); *Isogroup threshold* (500 contigs); *Isotig threshold* (100 contigs); *IsotigContig count threshold* (100 contigs); *IsotigContig Length threshold* (3 pb).

Etapa 3 – as sequências Singleton foram processadas pelo programa SeqCleanLucy⁹, em que foram removidas sequências muito pequenas, consideradas problemáticas, sequências contaminantes, de baixa qualidade ou complexidade.

Etapa 4 – as análises de similaridade totais dos *Isogroups>Isotigs>Contigs e Singletons* resultantes nas amostras do genótipo com cerosidade PF020037 (ES e EG) e sem cerosidade BRS020062 (EG) foram obtidas pelo programa BLAST, utilizando como valor de corte o 1.0E-3.

Etapa 5 – as anotações de Gene Ontology (GO)¹⁰ realizadas. Esse tipo de sequenciamento foi selecionado pelo fato de, na ocasião, não haver disponível genoma completo do trigo e, esse sistema, gerando fragmentos da ordem de 300 pb–400 pb em média, permitia uma montagem das sequências de forma mais correta sem genoma de referência.

Resultados e Discussão

Os genótipos de trigo (PF020037 e BRS020062) foram cultivados no campo experimental da Embrapa Cerrados sob regime hídrico de line source ou gradiente linear. No decorrer do experimento, praticamente não ocorreram precipitações e, como o experimento ocorreu no inverno, na antemanhã do plantio, as temperaturas mínimas chegaram a 10 °C (Figura 2). Os genótipos foram identificados por diferentes capacidades de produzir cerosidade foliar, que representa um mecanismo de tolerância ao estresse hídrico. Essa cerosidade foi observada de forma bastante clara visualmente e documentada por foto.

Na Figura 3, demonstram-se as fases fenológicas da cultura do trigo, segundo a escala de Zadoks (Zadoks et al., 1974) para a visualização daquelas de coleta de material para as análises que foram realizadas (Espigamento – 4.9 e Enchimento de grãos – 7.5) e, na Figura 4, pode ser observada uma visão geral dos cultivos de trigo em plantio sob line source. A parte central representa o ponto em que as plantas estão sendo irrigadas com quantidades ótimas de água para o cultivo. Nas extremidades, observa-se as plantas que

⁹ <http://sourceforge.net/projects/seqclean/>
<http://lucy.sourceforge.net/>

¹⁰ <http://www.geneontology.org/>

estão submetidas ao máximo do estresse. Na Figura 5, é observado o detalhe do vigor do genótipo ceroso (PF020037) no ponto com mais estresse, no final da fase de enchimento de grãos.

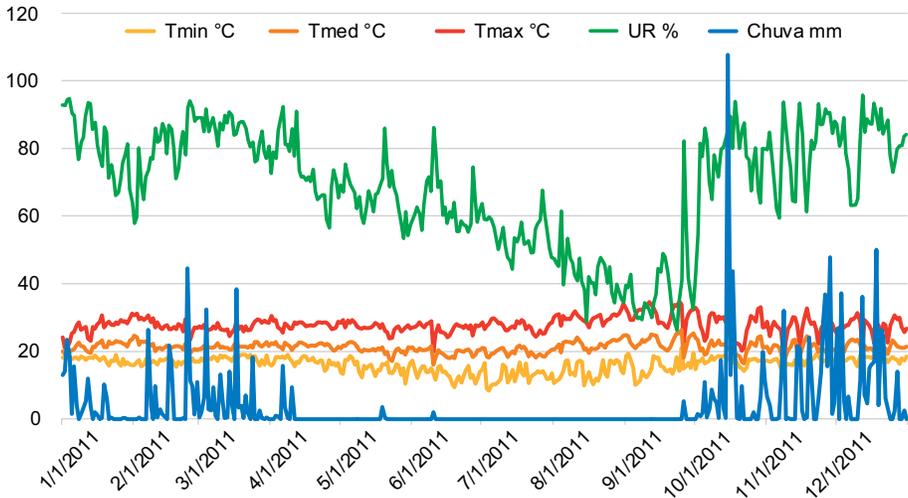


Figura 2. Dados climatológicos da Estação Experimental da Embrapa Cerrados, demonstrando a variação da umidade relativa, a temperatura e a precipitação pluviométrica no ano e período do experimento (maio a setembro). De maio a setembro, a precipitação foi ausente e a umidade relativa do ar decaiu de 92,8% a 30%. Dados gentilmente fornecidos por Edson Sano.

Fonte: Silva et al. (2017).

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Escala principal
0,0–0,9	1,0–1,9	2,0–2,9	3,0–3,9	4,0–4,9	5,0–5,9	6,0–6,9	7,0–7,9	8,0–8,9	9,0–9,9	Subfase
Germi- nação	Produção de folhas no talo principal	Produção de brotos	Produção de nós no talo principal	Bainha engros- sada	Espigado	Antesís	Estado leitoso do grão	Estado pastoso do grão	Amadure- cimento completo	

Figura 3. Esquema das fases fenológicas na cultura do trigo na escala e subescala de aproximação da FAO para o trigo¹¹. As setas vermelhas indicam as fases de coleta de material foliar para os estudos moleculares.

Fonte: baseado em Zadoks et al. (1974).

¹¹ <https://pt.scribd.com/document/319732725/Escala-Zadoks-Trigo#logout>

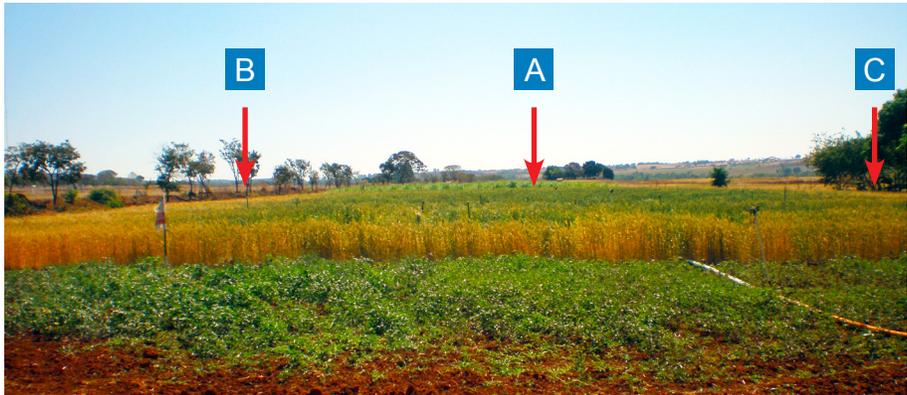


Foto: Maria Cristina Rocha Cordeiro

Figura 4. Área geral do experimento de cultivo do trigo no campo sob regime hídrico de line source. O ponto A representa a área de maior irrigação (sem estresse hídrico) e, os pontos B e C representam as áreas cujo estresse hídrico é máximo.



Foto: Maria Cristina Rocha Cordeiro

Figura 5. Detalhe do vigor do genótipo com maior cerosidade foliar (PF020037) na região de maior estresse hídrico, na fase de enchimento de grãos, em relação a outros genótipos avaliados na fenotipagem de 2011. A seta amarela indica o genótipo ceroso (PF020037).

A fase de espigamento (ES) (Escala de Zadoks 4.9) foi escolhida pela observação visual, clara, no genótipo PF020037 de cerosidade encontrada na folha, a partir dessa fase, na planta sob estresse hídrico (Ribeiro Júnior et al., 2006). As plantas presentes nos pontos com estresse já apresentavam

cerosidade e, aquelas presentes no ponto sem estresse não, vindo a acontecer em uma fase mais tardia do ciclo. Porém, a comprovação química desta observação ainda necessita ser obtida. A fase de enchimento de grãos (EG) foi escolhida por se tratar da fase em que a diferença do potencial hídrico é maior para as análises subsequentes de avaliação de produtividade, por ser uma das fases críticas da cultura cultivada nos campos do Cerrado Brasileiro.

Na Tabela 1, são mostradas as quantidades iniciais e finais de tecido utilizada, o RNA total e o RNA poliA+ obtidos de cada amostra utilizada. Esses procedimentos de extração de RNA e seleção do RNA poliA+ demonstraram, aproximadamente, o mesmo padrão de resultado com respeito à quantidade de RNA resgatado/variedade/condição. A maior diferença foi com a variedade mais cerosa na fase de enchimento de grãos que, mesmo sem estresse, necessitou do dobro da quantidade de material para se obter a mesma quantidade de RNA e a variedade sem cerosidade uma maior facilidade para a obtenção de RNA nas mesmas condições ambientais. Não se sabe se esses efeitos podem ser devido à ausência/presença de produção de cerosidade ou a outros eventos moleculares presentes na cutícula da folha no genótipo PF020037, sendo este dado considerado pontual devido ao genótipo diferente ou a algum procedimento de coleta ou, ainda, o armazenamento dos materiais vegetais. Todos os RNAs obtidos também demonstraram estarem íntegros na análise em gel de agarose (Figura 6) como também sua qualidade foi confirmada em Bioanalyzer (Agilent).

Tabela 1. Resultado da eExtração do RNA dos genótipos de trigo.

Variedade	Quantidade de material vegetal (g)	Quantidade média de RNA total final (mg)	Quantidade média de RNA poliA+ final (µg)
37E (EG)	2	1,5	3,3
37N (EG)	4	1,7	2,0
62E (EG)	2	2,8	2,3
62N (EG)	2	2,6	4,5
37E (ES)	2	1,0	–
37N (ES)	2	2,5	–

Obs. Genótipo 37 (PF020037), Genótipo 62 (BRS020062); ES – espigamento (escala de Zadoks 4.9); EG – enchimento de grãos (escala de Zadoks 7.5), N – não estresse; E – com estresse.

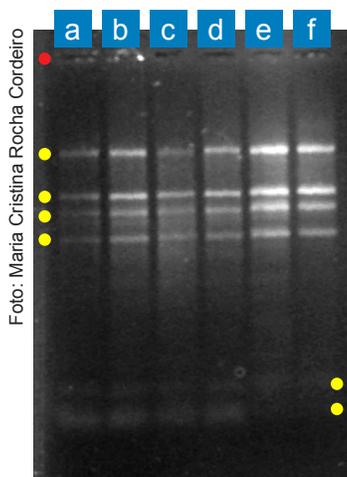


Foto: Maria Cristina Rocha Cordeiro

Figura 6. Gel de agarose 1,5% demonstrando a integridade do RNA extraído das plantas para construção de bibliotecas de cDNA e sequenciamento na Plataforma 454 GS FLX Roche. (a) amostra 37 E(ES); (b) amostra 37 N (ES); (c) amostra 62 E (EG); (d) amostra 62 N (EG); (e) amostra 37 E (EG); (f) amostra 37 N (EG). ES – fase de espigamento; EG – fase de enchimento de grãos. O ponto Vermelho demonstra a ausência de DNA genômico contaminante no poço (alto do gel) e os pontos em amarelo destacam as bandas referentes a RNA ribossomal ou menores, RNA transportador (baixo do gel), que normalmente são visualizados nesse perfil.

O resultado das bibliotecas subtrativas demonstrou que, na biblioteca do genótipo ceroso (PF020037), o número de sequências resultantes após a subtração foi muito superior do que o da biblioteca genótipo não ceroso (576: 44, respectivamente – Tabela 2). Não se sabe se esses resultados foram devidos a algum problema relacionado com a subtração da biblioteca ou podem estar expressando uma situação durante o estresse no genótipo PF020037. Para a biblioteca do genótipo ceroso, foram observadas muitas sequências relacionadas com retrotransposons. Praticamente dois terços da biblioteca foi representada por essas sequências e, mesmo com procedimentos para limpeza com programas de análise específicos, ainda permaneceu com algum residual. Esse tipo de sequências parece ser normal de serem encontradas em cereais e já foram relacionadas como presentes e coadjuvantes durante uma grande indução de expressão de genes. A presença de transposons foi confirmada com o recente sequenciamento genômico do trigo, pois foi comprovado que realmente existem muitas sequências de transposons nesse genoma (Walkowiak et al., 2020). Assim, o observado nessa análise parece estar expressando, ao menos de forma parcial, a realidade desse genoma, nesse transcriptoma. Na análise em RNA-seq, foi demonstrado que o número de sequências nos genótipos sob estresse, tanto nas fases de espigamento (escala de Zadoks 4.9) quanto no enchimento de grãos (escala de Zadoks 7.5), é superior com relação ao número de sequências obtidas das plantas sem estresse em todos os casos analisados (Tabela 2). Esse resultado quan-

titativo está em acordo com o resultado que obtivemos com as bibliotecas subtrativas de cDNA.

Tabela 2. Resultado Geral das Análises de Sequenciamento das bibliotecas subtrativas de cDNA e RNA-seq (Plataforma 454 GS FLX Roche).

Genótipo	Fase fenológica (pB)	Condição	Número de sequência total (análise)		Tamanho médio da read obtida (pB)
			Biblioteca subtrativa de cDNA	RNAseq	
PF020037	ES	NE	-	249.318	391.509
PF020037	ES	E	-	336.116	396.128
PF020037	EG	NE	576 (9)	319.590	418.811
PF020037	EG	E		403.929	418.988
BRS020062	EG	NE	44 (24)	200.874	419.21
BRS020062	EG	E		478.302	398.78

Obs. NE – não estressada; E- estressada; ES – espigamento; EG – enchimento de grãos. Em vermelho, são destacados o número de sequências consistentes totais das bibliotecas subtrativas de cDNA.

De 576 cDNAs sequenciados resultantes da biblioteca subtrativa no genótipo ceroso PF020037, após a análise de bioinformática, somente 35 sequências puderam ser anotadas, das quais, nove foram consideradas consistentes; 16 não consistentes; e dez sequências caracterizadas como no hit (sem homologia conhecida) (Figura 7). Assim, o número final de sequências anotadas e efetivamente caracterizadas foram somente nove sequências (Tabela 2). O ponto de corte foi com Evalue e 10^{-4} .

Na biblioteca subtrativa do genótipo não ceroso BRS020062, foram obtidos 44 cDNAs totais na biblioteca, dos quais, de 32 sequências anotadas, 24 foram consideradas consistentes; 7, inconsistentes; e 1 considerada no hit (Figura 7). As sequências geradas na biblioteca subtrativa do genótipo não ceroso foram consideradas, de uma maneira geral, melhores do que as do genótipo ceroso, porque demonstraram maior qualidade; o número quantitativo final de sequências consistentes, 24 sequências, superior em relação ao número da biblioteca subtrativa do genótipo ceroso PF020037 (9) (Tabela 2, Figura 7). A presença de sequências consideradas no hit em ambas as bibliotecas expressa sequências gênicas potenciais novas que ainda não foram

caracterizados e/ou relacionados com algum processo ou sistema ainda ausente no banco de dados disponível utilizado para a análise BlastX.

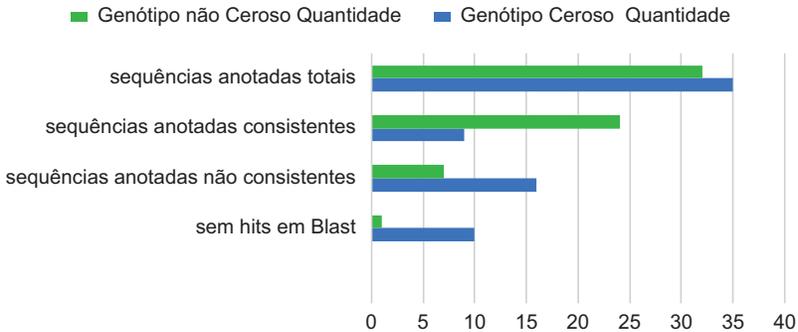


Figura 7. Resultado da anotação das sequências encontradas nas bibliotecas subtrativas de cDNA.

A maior parte dos *top hits* encontrados em ambos os casos tiveram maior homologia com *Triticum* (*T. aestivum*, *T. monococcum*), *Hordeum vulgare* e *Oryza sativa* mas, também, houve sequências com homologia a outros organismos como o *Harpegnathos saltador* (inseto) e outras, especialmente entre as sequências resultantes da biblioteca subtrativa do genótipo ceroso demonstrando, mais uma vez, uma certa inconsistência de dados (Figura 8).

Com o resultado de um número quantitativamente menor de sequências consistentes na biblioteca subtrativa do genótipo ceroso foi observado que, no genótipo não ceroso (BRS020062), os resultados das possíveis relações de componentes funcionais em nível molecular também apresentaram dados mais enriquecedores de informações (Figuras 9 e 10).

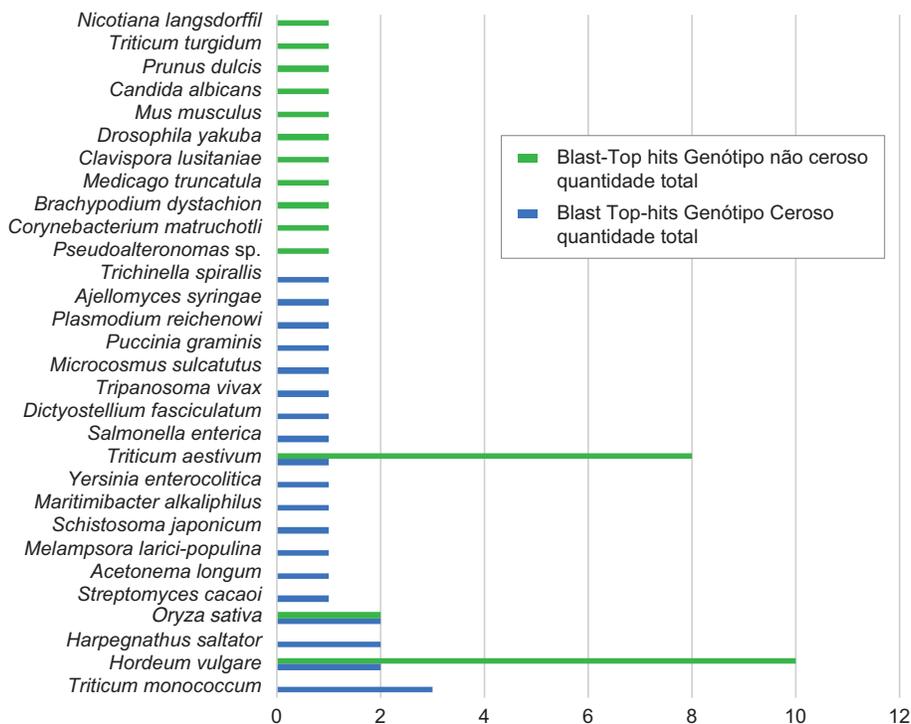


Figura 8. Distribuição dos Blast-Top hits por espécies das sequências encontradas nas bibliotecas subtrativas de cDNA do genótipo ceroso e não ceroso.

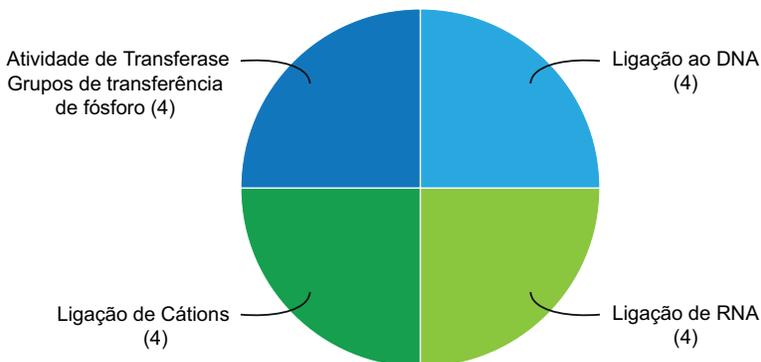


Figura 9. Resultado da análise do componente de função molecular das sequências na biblioteca subtrativa de cDNA no genótipo ceroso PF020037.

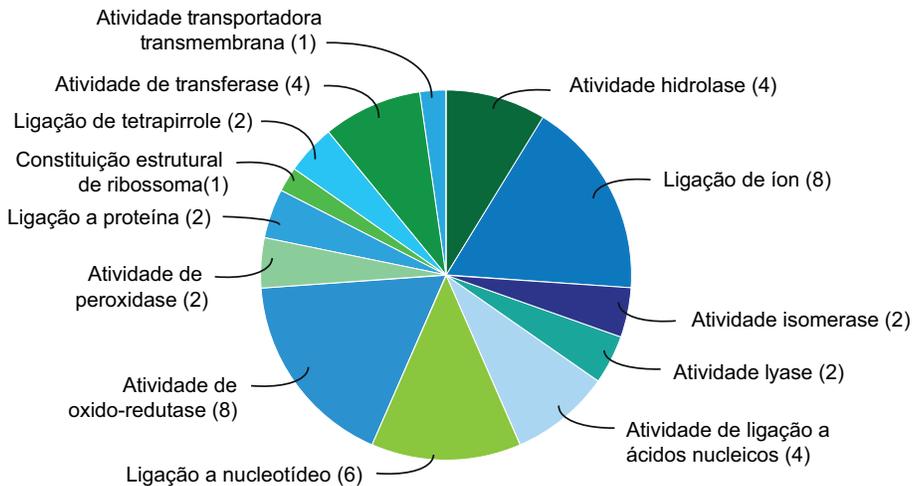


Figura 10. Resultado da análise do componente de função molecular das sequências na biblioteca subtrativa de cDNA no genótipo não ceroso BRS020062.

Foram observadas sequências, por exemplo, possivelmente relacionadas com sistemas de oxidorredução ou ação de peroxidase, que são consistentes com os sistemas de defesa da planta submetida a diferentes tipos de estresse, entre outros possíveis processos metabólicos constituintes na planta (Abid et al., 2018). No resultado da biblioteca do genótipo ceroso, foi observado expressão de genes possivelmente relacionados à regulação da expressão de genes (ligação a DNA e RNA) ou a cadeia respiratória (relacionados com os processos metabólicos ou fotossintético), que, também, tem fundamento na literatura, pois, hoje, já é bem conhecido que, durante os diferentes processos de estresses vegetais, esses sistemas biológicos são afetados (Bhatla et al., 2018; QIU et al., 2017; Zhang et al., 2018).

Em comparação com as análises com bibliotecas subtrativas de cDNA, a análise do RNA-seq expressou um poder muito superior em demonstrar a expressão gênica durante o processo de estresse de seca em condição de campo, nos dois genótipos.

O número de sequências gênicas geradas (potenciais genes) foi muito maior em todas as amostras: 62M (EG), 62N (EG), 37E (EG), 37N (EG), 37E (ES) e 37N (ES) analisadas, (da ordem de, ao menos, 10^4 vezes superior),

como pode ser observado na Tabela 2. Assim, a análise de RNA-seq demonstra que supera, em muito, a análise com as bibliotecas subtrativas de cDNA.

As análises de bioinformática do RNAseq identificaram que o tamanho médio de reads consideradas consistentes para alinhamento em isogrupos, isotigs e contigs foi aproximadamente o mesmo de 400 pb (Tabela 2). Os isogrupos ocorrem devido a variantes de processamento de RNA mensageiro (RNAm).

Com base na análise da montagem das sequências realizada no RNAseq, os resultados obtidos foram categorizados a partir de Isotigs constituídas (que representam sequências homólogas que se sobrepõem para constituir sequências gênicas maiores ou completas e/ou sequências do tipo Singleton, que representam sequências que não tem sobreposição com nenhuma outra, para a genótipo ceroso PF020037 nas fases de espigamento na escala de Zadoks 4.9) e de enchimento de grãos (escala de Zadoks 7.5) e, o genótipo não ceroso, BRS020062, nessas mesmas fases respectivamente.

Para os componentes principais, como genes associados a processos biológicos, componentes celulares, de função molecular específica ou sem função definida, foi observado que, nessa análise total, apenas no genótipo não ceroso, o componente do número de genes sem função definida (genes novos) obtidos é consideravelmente superior. Sendo o percentual dos demais componentes categorizados bastante semelhantes (Figura 11).

Na análise em que se refina um pouco a primeira informação sobre componentes e já separa as sequências encontradas com possíveis funcionalidades moleculares, observa-se que, na análise das Isotigs e Singleton totais, as funcionalidades gênicas potenciais mais presentes em todas as fases e os genótipos estudados estão relacionadas com atividades catalíticas, de ligação, genes/proteínas não classificadas (genes novos) e de ligação de fatores de transcrição aos ácidos nucleicos. Todas essas atividades estão mais presentes nas amostras em enchimento de grãos (escala de Zadoks 7.5) quando comparada à fase de espigamento (escala de Zadoks 4.9). Somente nas sequências singleton essas funcionalidades, na fase de espigamento (escala de Zadoks 4.9), são expressas em maior quantidade. Também, em uma escala abaixo de cem sequências totais, observa-se atividade molecular estrutural, atividade de regulação enzimática, atividade carreadora de elétrons, atividade de transdução molecular, atividade receptora e atividade antioxidada-

tiva. As atividades relacionadas com processos moleculares estruturais e as relacionadas com receptores aparecem em maior quantidade nas amostras em enchimento de grãos (escala de Zadoks 7.5), independente do teor de cerosidade na folha do genótipo estudado. Há também, em baixa quantidade, atividades relacionadas com metalo chaperonas que normalmente se expressam sob situações de estresse (Figuras 12 e 13).

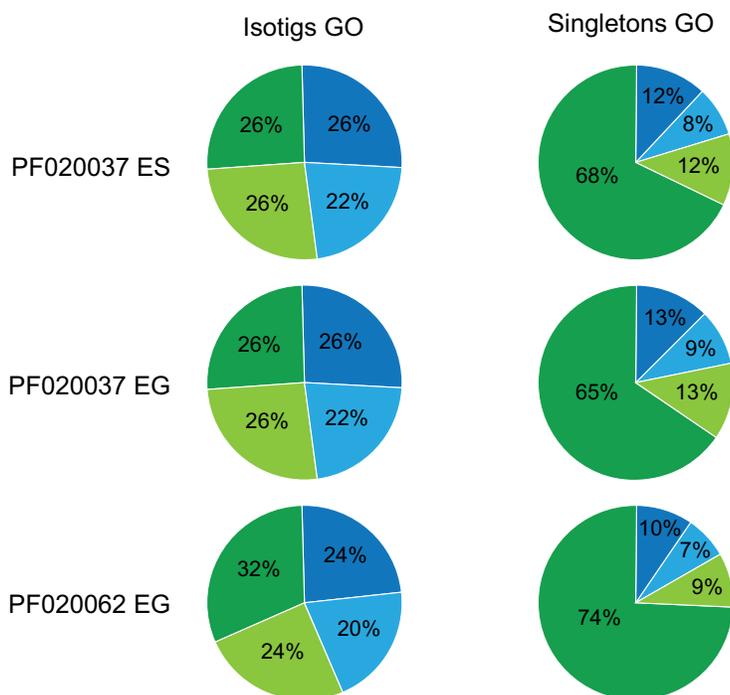


Figura 11. Componentes principais totais Gene Ontology (GO) das sequências Isotigs e Singleton para os genótipos ceroso (PF020037) e não ceroso (BRS020062), durante as fases de espigamento (ES) e enchimento de grãos (EG) na análise do RNAseq. Legenda: azul escuro – componente biológico; azul claro – componente celular; verde claro – componente molecular; verde escuro – sem função definida.

Todas essas atividades são perfeitamente coerentes com a resposta de defesa de plantas a estresses ambientais. Como parte do arsenal de defesa, existem uma aumentada expressão de genes e de ação de fatores de transcrição, pois, são esses, acompanhados por micro RNAs (miRNA), os grandes mediadores deste processo (El-Esawi et al., 2019; Li et al., 2019). A ação de

transportadores diferentes, como, por exemplo, aqueles presentes em canais de cálcio, bomba de sódio:potássio:ATPases, que modificam o padrão iônico meio extra/intracelular alterando os processos de oxidorredução relacionados à homeostase intracelular. Esses processos oxidativos ocorrem devido à intensificação de múltiplas ações enzimáticas como ação de fosforilases e fosfatases entre outras (Cui et al., 2018; Chen et al., 2017; Hossain et al., 2016). Além disso, a resposta de defesa de plantas requer um grande consumo energético, o que poderia justificar a presença de componentes relacionados com atividade de reserva de nutrientes. Esse componente, contudo, está presente em muito baixa quantidade e muito pouco visível (somente traços) nas Figuras 12 e 13 quando comparado aos demais.

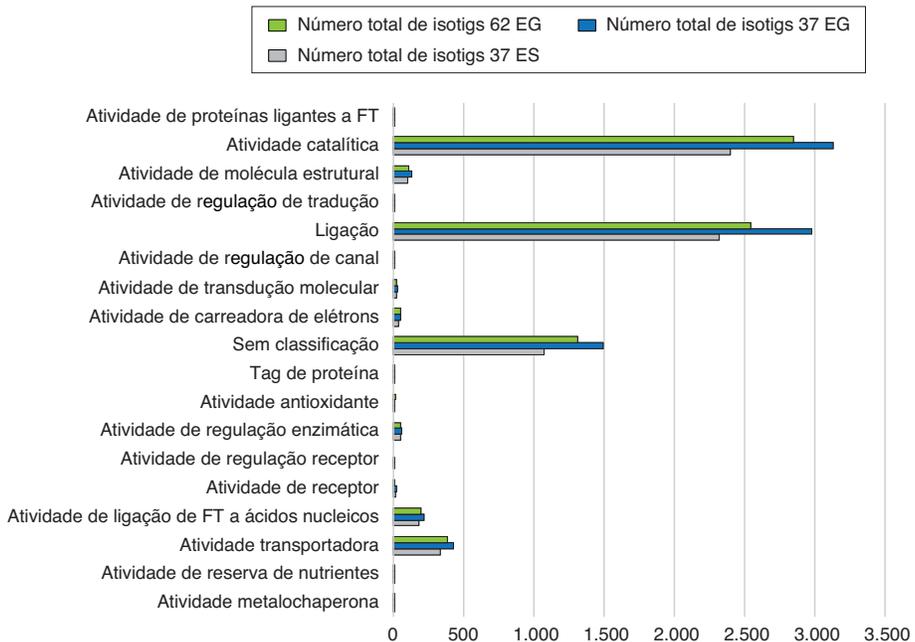


Figura 12. Análise total GO dos componentes principais de funcionalidade molecular potencial das sequências Isotigs (número total) obtidos no transcriptoma de trigo nas amostras ES (espigamento – escala de Zadoks 4.9), EG (enchimento de grãos – escala de Zadoks 7.5) nos genótipos PF020037 e BRS020062. Legenda: Cinza – representa a variedade cerosa PF020037 na fase de espigamento; Azul – representa a variedade cerosa PF020037 na fase de enchimento de grãos; e Verde – representa a variedade não cerosa PF020062 na fase de enchimento de grãos.

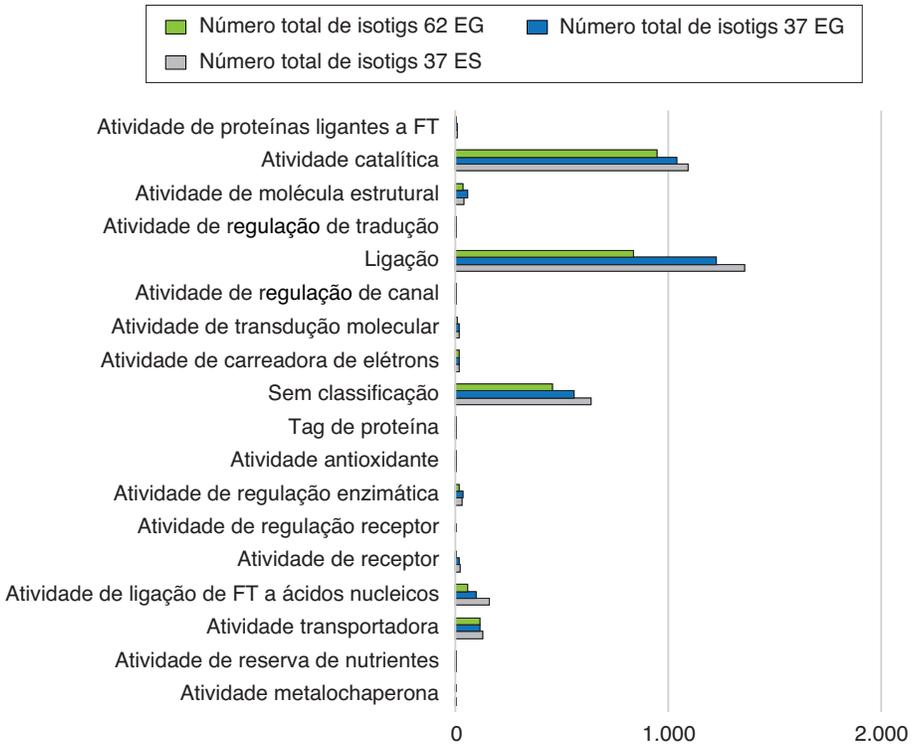


Figura 13. Análise total GO dos componentes principais de funcionalidade molecular potencial das sequências Singleton (número total) obtidas no transcriptoma de trigo nas amostras ES (espigamento – escala de Zadoks 4.9), EG (enchimento de grãos – escala de Zadoks 7.5) nos genótipos PF020037 e BRS020062. Legenda: Cinza – representa a variedade cerosa PF020037 na fase de espigamento; Azul – representa a variedade cerosa PF020037 na fase de enchimento de grãos e Verde – representa a variedade não cerosa PF020062 na fase de enchimento de grãos.

A demanda de expressão de genes na fase de espigamento (escala de Zadoks 4.9) do genótipo PF020037 (Figuras 12 e 13), além da situação de estresse hídrico e outros no campo pode ser também devido ao fato de que a planta ainda está em desenvolvimento e, por isso, requerendo o aumento de expressão de vários genes e, talvez, inclusive, aqueles relacionados com a biossíntese de cerosidade como um fator protetor ao estresse de seca (Bi et al., 2017; Xue et al., 2017; Patwari et al., 2019).

Por não apresentar cerosidade na cutícula e ser mais sensível por outras características, o genótipo BRS020062 necessita incrementar os processos de expressão gênica para superar o estresse (Figuras 12 e 13). O desvio do consumo energético causado para incrementar a resposta de defesa da planta ao estresse à seca resulta na diminuição da taxa de crescimento da planta, bem como na redução da produtividade ou perda de qualidade, de modo que a planta possa ainda conseguir sobreviver (Ullah et al., 2018).

Um número superior de expressão gênica na fase mais tardia (enchimento de grãos) (Figuras 12 e 13) pode ser atribuído também ao fato de que esta última é aquela em que a planta incrementa a sua produtividade. Os grãos (sementes) contêm uma grande quantidade de energia “embutida” na forma de proteínas, de enzimas e de outros fatores para atender as necessidades de desenvolvimento do embrião (futura nova planta). Para que isso aconteça, é necessário incrementar a síntese de proteína nessa fase e todos os sistemas biológicos e enzimáticos para esse fim. Além disso, a planta ainda necessita incrementar a atividade dos sistemas biológicos e fisiológicos relacionados às diversas respostas de defesa aos estresses ambientais da planta em campo (seca, calor, salinidade, patógenos) para conseguir superar e sobreviver com uma boa produtividade (Ullah et al., 2018).

A seguir, são apresentadas outras considerações possíveis com o resultado da análise de RNAseq.

O gene mais expresso no genótipo ceroso na fase de espigamento (escala de Zadoks 4.9) é potencialmente uma proteasome alfa subunidade A1 de atividade transportadora. Esta é expressa 900 vezes mais do que na planta sem estresse. Os oito genes subsequentes encontrados não apresentam homologia conhecida e variam de expressão de 600 a 200 vezes em relação à planta não estressada (Tabela 3).

Na fase de enchimento de grãos, os top 10 genes mais expressos no genótipo ceroso também têm homologia desconhecida (no hit) e suas expressões variam de 500 a 200 vezes em relação a planta não estressada.

Como já mencionado, a presença de sequências gênicas sem classificação (no hit) expressa o poder da metodologia do RNAseq na identificação de potenciais sequências gênicas novas para compreensão dos diversos sistemas e processos na planta durante o estresse hídrico no campo. Este resul-

tado está presente neste transcriptoma e em acordo com o encontrado na análise com bibliotecas subtrativas de cDNA (Figuras 7, 12 e 13).

Tabela 3. Potenciais seqüências gênicas com expressão significativa durante o estresse à seca na Análise 454 GS FLX (Roche).

Genótipo ceroso		Genótipo não ceroso
Escala Zadoks 4.9	Escala Zadoks 7.5	Escala Zadoks 7.5
Proteasome Alfa Subunit A1(+900X)	–	–
Seqüência de homologia não identificada (Top 8 genes +200-600X)	Seqüência de homologia não identificada (Top 10 genes +200-500X)	Seqüência de homologia não identificada (+600X)
DREB 2A	DREB 2A	DREB
WRKY	WRKY	WRKY
MYB	MYB	–
Genes relacionados com a biosíntese de cera	Genes relacionados com a biosíntese de cera	–
Genes relacionados com a biosíntese de cutina	Genes relacionados com a biosíntese de cutina	–
Genes relacionados com a biosíntese de suberina	Genes relacionados com a biosíntese de suberina	–
Genes relacionados com a biosíntese de etileno	Biosíntese de etileno e citocianinas (Isopentenil transferase – IPT)	Genes relacionados com a biosíntese de etileno

Na variedade cerosa, nas duas fases fenológicas analisadas, foram encontrados genes relacionados com potenciais fatores de transcrição como, por exemplo, DREB 2A, WRKY, MYB, o que demonstra a expressão de genes relacionados com regulação ou expressão de genes ser importante nesse sistema, corroborando ao já relatado na literatura corrente (El-Esawi et al., 2019; Li et al., 2019). Também foi possível observar genes relacionados com biosíntese de cera, formação de cutina, suberina ou parede celular, o que corrobora com a observação morfológica visual para este genótipo, em que se identifica a presença de cerosidade em folhas a partir da fase de espigamento (escala de Zadoks 4.9) (Bl et al., 2017; Ribeiro Junior et al., 2006). Esse deve ser, certamente, um de seus mecanismos de resposta de defesa

expressando em um fenótipo mais tolerante. Outros genes de controle hormonal, tais como os relacionados com a biossíntese de etileno ou com a biossíntese de citocianinas, como a isopentenil transferase (IPT), que já foi relatado, em arroz, como um gene capaz de induzir uma certa tolerância à seca, pois garante uma homeostasia entre os processos source: sink (Ullah et al., 2018; Hossain et al., 2016; Reguera et al., 2013; Peleg et al., 2011). Esse gene também foi encontrado nesse transcriptoma. Porém, somente foi encontrado na fase de enchimento de grãos (escala de Zadoks 7.5), aparentemente em baixa expressão e somente na planta não estressada. Esse achado poderia ser um indicativo de que, apesar da cerosidade cuticular observada nesse genótipo, o efeito da biossíntese de citocianinas – mantendo a homeostase entre os processos de fotossíntese e metabolismo (especialmente síntese de proteínas na fase de enchimento de grãos, escala de Zadoks 7.5), descritos em plantas de arroz tolerante (REGUERA et al., 2013; PELEG et al., 2011) –, pode não estar presente nessa cultivar. Porém, mais experimentos são necessários para responder completamente essa questão.

No genótipo não ceroso, o gene mais abundante também não tem homologia conhecida (no hit) e está expresso 600 vezes a mais do que na planta não estressada. Outros genes relacionados com fatores de transcrição DREB, WRKY também podem ser encontrados, mas não foi encontrado isopentenil transferase ou genes relacionados com controle hormonal. Somente genes relacionados com a biossíntese de etileno. Esse dado também pode ser explicado porque este fitormônio está associado à condição de senescência, que representa a fase final nas plantas suscetíveis ou não tolerantes ao baixo teor de umidade ou outros estresses abióticos e bióticos (Ullah et al., 2018).

O resultado gerado na análise de RNA-seq é bastante complexo e todos os resultados apresentados aqui necessitam ser estudados e validados com mais experimentos. Inclusive, a demonstração do aumento da cerosidade em folhas do genótipo ceroso aqui estudado. Entretanto, com o exposto, é possível observar o poder que a metodologia oferece para novos estudos e para a elucidação de processos e mecanismos biológicos complexos como a tolerância à seca em plantas. Todos esses estudos são necessários na inovação de melhores tecnologias capazes de superar possíveis ameaças à produtividade agrícola devido às mudanças climáticas.

Ressalta-se, com o sequenciamento completo do genoma do trigo, o resultado do sequenciamento deste transcriptoma em genótipos de respostas contrastantes à seca, fenotipadas em campo no Cerrado Brasileiro, pode servir para subsidiar novos trabalhos a partir de uma nova montagem desse transcriptoma. Entre estes, aqueles com o objetivo de identificação dos principais mecanismos fisiológicos em nível genético de tolerância à seca em plantas cultivadas nessa região, que é considerada uma área de expansão para a cultura, bem como, caracterização de novos genes e marcadores para serem utilizados em processo de genotipagem e fenotipagem nessa cultura em campo, agregando informações nos mapas genéticos ou auxiliando análises de sintenia entre genótipos relacionados ou, ainda, subsidiar estratégias para o desenvolvimento de plantas mais tolerantes pelas metodologias do DNA recombinante.

O estudo de fenotipagem de plantas tolerantes à seca em campo, ainda, subsidia decisões para o uso eficiente de água de irrigação para a cultura do trigo plantado em safrinha ou na estação seca do Cerrado brasileiro, contribuindo para a prática de cultivo sustentável em atenção aos objetivos do desenvolvimento sustentável da Organização das Nações Unidas (ONU), Agenda 2030.

De uma forma geral, comparando-se o resultado da funcionalidade dos genes potenciais resultantes, gerados nas bibliotecas subtrativas com a análise total de potenciais genes do RNAseq, pode ser dito que as sequências gênicas consistentes resultantes das bibliotecas subtrativas de cDNA parecem estar englobadas no resultado das possíveis funções ou relação de processos fisiológicos-genéticos resultantes da montagem realizada na análise de RNAseq. Entretanto, essa segunda análise amplia muito essa categorização. Talvez, uma única vantagem da análise com bibliotecas subtrativas seja a de maximizar a identificação de genes mais específicos e diferenciais, mas, não necessariamente, aqueles que ocorrem em baixa expressão. Mas essa abordagem deve ser superada por meio do sequenciamento RNAseq em uma única célula (Shulze et al., 2019).

Os avanços ainda mais prementes da metodologia do RNAseq e o sequenciamento completo do genoma do trigo, com os sistemas Illumina (Illumina Inc.) e Pacific Bioscience Company (PacBio) ou outros, associados com os marcadores caracterizados em vários mapas genéticos e outras análises

lises, permitem dizer que o potencial do RNAseq em gerar informações de expressão gênica e serem identificadas sequências gênicas novas para a compreensão dessa complexa resposta de defesa da planta (estresse hídrico no campo associado com o de calor, salinidade e de patógenos) é enorme e é uma metodologia indispensável para ser integrada nos projetos com a finalidade de geração de inovações para a tolerância à seca em vista das mudanças climáticas.

Conclusões

Este trabalho permite concluir que:

As estratégias de construção de bibliotecas subtrativas de cDNA e sequenciamento de transcriptomas (RNA-seq) permitem a seleção e a caracterização de genes relacionados em processos fisiológicos-genéticos intracelulares. Entretanto, a estratégia do RNA-seq é consideravelmente muito mais eficiente para seleção, identificação e caracterização.

As análises realizadas com os dados das sequências categorizadas, de uma forma total, e por funcionalidade molecular potencial, permitem demonstrar uma grande expressão gênica entre os genótipos estudados. Sendo os potenciais genes mais expressos apresentam atividade em processos relacionados com atividade de expressão e regulação gênica; ligação à fatores de transcrição (FT) em ácidos nucleicos ou proteínas à FT, atividade catalíticas ou de regulação enzimática e proteínas receptoras, transportadoras e relacionadas com o sistema de oxidorredução. Todos esses já bem caracterizados na literatura para o estresse ambiental. Esses dados, contudo, representam um potencial e necessitam mais experimentos e estudos com o objetivo de comprovar e validar em condições de campo.

Este resultado de sequenciamento de transcriptoma em genótipos de trigo em condição de estresse hídrico em campo na região do Cerrado brasileiro pode servir para subsidiar novos trabalhos, pois as informações geradas podem ser utilizadas para uma montagem mais fidedigna, como também, para a comprovação dos principais mecanismos de tolerância à seca em plantas cultivadas nessa região para serem utilizados em processo de genotipagem e fenotipagem em campo.

Referências

- ABID, M.; SHAFQAAT ALI, S.; QI, L. K.; ZAHOR, R.; TIAN, Z.; JIANG, D.; SNIDER, J. L.; DAI, T. Physiological and biochemical changes during drought and recovery periods at tillering and jointing stages in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 4615, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-21441-7
- ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, A. G. da (ed.). **Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. 2 v. 1337 p.
- BHATLA, S. C.; LAL, M. (ed.). **Plant physiology, development and metabolism**. Singapore: Springer Nature, 2018. 1251 p.
- BI, H.; KOVALCHUK, N.; LANGRIDGE, P.; TRICKER, P. J.; LOPATO, S.; NIKOLAI BORISJUK, N. The impact of drought on wheat leaf cuticle properties. **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 85, 13 p., 2017.
- CHEN, Y. E.; JUN-MEI CUI, J. -M.; SU, Y. -Q.; ZHANG, C. -M.; MA, J.; ZHANG, Z. -W.; YUAN, M.; LI, W. -J.; ZHANG, H. -Y.; YUAN, S. Comparison of phosphorylation and assembly of photosystem complexes and redox homeostasis in two wheat cultivars with different drought resistance. **Scientific Reports**, v. 7, 12718, 16 p., 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-13145-1
- CUI, X. Y.; DU, Y. -T.; FU, J. D.; YU, T. -F.; WANG, C. -T.; CHEN, M.; CHEN, J.; MA, Y. -Z.; XU, Z.-S. Wheat CBL-interacting protein kinase 23 positively regulates drought stress and ABA responses. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 93, 13 p., 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1306-5>. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212411>
- EL-ESAWI, M. A.; ABDULLAH, A. A. -G.; ALI, H. M.; AHMAD, M. Overexpression of atWRKY30 transcription factor enhances heat and drought stress tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Genes**, v. 10, n. 163, 13 p., 2019. DOI: 10.3390/genes10020163.
- GUAN, J.; GARCIA, D. F.; ZHOU, Y.; APPELS, R.; LI, A.; MAO, L. The battle to sequence the bread wheat genome: a tale of the three kingdoms. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2019.09.005>
- HANKS, R. J.; KELLER, J. K.; RASMUSSEN, V. P.; WILSON, G. D. Line source sprinkler for continuous variable irrigation-crop production studies. **Soil Science Society of America Journal**, v. 40, p. 426-429, 1976.
- HOSSAIN, M. A.; WANI, S. H.; BHATTACHARJEE, S.; BURRITT, D. J.; TRAN, L. -S. P. Drought stress tolerance in plants: physiology and biochemistry. Switzerland: **Springer**. v. 1, 40 p., 2016.
- KHAN, S.; ANWAR, S.; YU, S.; SUN, M.; YANG, Z.; GAO, Z. -Q. Development of drought-tolerant transgenic wheat: achievements and limitations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, 3350, 2019. DOI: 10.3390/ijms20133350.
- LI, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, N.; WENYING ZHANG, W.; MENGJUN LI, M.; LIU, B.; SHI, Z. MYB-CC transcription factor, TaMYBsm3, cloned from wheat is involved in drought tolerance. **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 143, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1751-9>.
- MARČEK, T.; HAMOW, K. A.; JANDA, B. T.; DARKO, E. Metabolic response to drought in six winter wheat genotypes. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, 2019.
- MOSA, N.; ATANAS, A.; ATANASSOV, I. Future challenges of plant biotechnology and genomics. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n. 2, p. 27-142, 2010.

- PATWARI, P.; SALEWSKI, V.; GUTBROD, K.; KRESZIES, T.; DRESEN-SCHOLZ, B.; PEISKER, H.; STEINER, U.; MEYER, A.J.; SCHREIBER, L.; DORMANN, P. Surface wax esters contribute to drought tolerance in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 98, p. 727-744, 2019. DOI: 10.1111/tpj.14269.
- PELEG, Z.; REGUERA, M.; TUMIMBANG, E.; WALIA, H.; BLUMWALD, E. Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, n. 7, p. 747-758, 2011.
- QASEEM, M. F.; QURESHI, R.; MUQADDASI, Q.; SHAHEEN, H.; KOUSAR, R.; RODER, M. S. Genome-wide association mapping in bread wheat subjected to independent and combined high temperature and drought stress. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199121>.
- QIU, Z.; YUAN, M.; HE, Y.; LI, Y.; ZHANG, L. Physiological and transcriptome analysis of He-Ne laser pretreated wheat seedlings in response to drought stress. **Scientific Reports**, v. 7, n. 6108, 2017. DOI:10.1038/s41598-017-0651.
- REGUERA, M.; PELEG, Z.; ABDEL-TAWAB, Y. M.; TUMIMBANG, E. B.; DELATORRE, C. A.; BLUMWALD, E. Stress-induced cytokinin synthesis increases drought tolerance through the coordinated regulation of carbon and nitrogen assimilation in rice. **Plant Physiology**, v. 163, n. 4, p. 1609-1622, 2013.
- RIBEIRO JÚNIOR, W. Q.; RAMOS, M. L. G.; VASCONCELOS, U.; TRINDADE, M. da G.; FERREIRA, F. M.; SIQUEIRA, M. M. H.; SILVA, H. L. M. da; RODRIGUES, G. C.; GUERRA, A. F.; ROCHA, O. C.; AMÁBILE, R. F.; ALBUQUERQUE, A. C.; SÓ e SILVA, M.; ALBRECHT, J. C.; DURÃES, F. O. M. **Fenotipagem para tolerância à seca visando o melhoramento genético do trigo no cerrado**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 24 p. html. (Embrapa Trigo. Circular técnica online, 21).
- SALLAM, A.; ALQUDAH, A. M.; DAWOOD, M. F. A.; BAENZIGER, P. S.; BÖRNER, A. Drought stress tolerance in wheat and barley: advances in physiology, breeding and genetics research. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3137, 2019. DOI: 10.3390/ijms20133137, 1 jul. 2019.
- SANTOS, H. G. dos; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C. dos; OLIVEIRA, V. A. de; LUMBREERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A. de; ARAUJO FILHO, J. C. de; OLIVEIRA, J. B. de; CUNHA, T. J. F. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 5. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2018.
- SHULSE, C. N.; COLE, B. J.; CIOBANU, D.; LIN, J.; YOSHINAGA, Y.; GOURAN, M.; TURCO, G. M.; ZHU, Y.; O'MALLEY, R. C.; BRADY, S. M.; DICKEL, D. E. High throughput single cell transcriptome profiling of plant cell types. **Cell Reports**, v. 27, n. 7, p. 2241- 2247, 2019.
- SILVA, F. A. M. da; EVANGELISTA, B. A.; MALAQUIAS, J. V.; OLIVEIRA, A. D. de; MULLER, A. G. **Análise temporal de variáveis climáticas monitoradas entre 1974 e 2013 na estação principal da Embrapa Cerrados**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2017. 121 p. (Embrapa Cerrados. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 340).
- ULLAH, A.; MANGHWAR, H.; SHABAN, M.; HAMID, A.; KHAN, H.; AKBAR, A.; ALI, U.; ALI, E.; FAHAD, S. Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 33103-33118, 2018. DOI: doi.org/10.1007/s11356-018-3364-5. 2018.
- WALKOWIAK, S.; GAO, L.; MONAT, C.; HABERER, G.; KASSA, M. T.; BRINTON, J.; RAMIREZ-GONZALEZ, R. H.; KOLODZIEJ, M. C.; DELOREAN, E.; THAMBUGALA, D.; KLYMIUK, V.; BYRNS, B.; GUNDLACH, H.; BANDI, V.; SIRI, J. N.; NILSEN, K.; AQUINO, C.; HIMMELBACH, A.; COPETTI, D.; BAN, T.; VENTURINI, L.; BEVAN, M.; CLAVIJO, B.; KOO,

D-H.; ENS, J.; WIEBE, K.; N'DIAYE, A.; FRITZ, A.K.; GUTWIN, C.; FIEBIG, A.; FOSKER, C.; FU, B. X.; ACCINELLI, G. G.; GARDNER, K. A.; FRADGLEY, N.; GUTIERREZ-GONZALEZ, J.; HALSTEAD-NUSSLOCH, G.; HATAKEYAMA, M.; KOH, C. S.; DEEK, J.; COSTAMAGNA, A. C.; FOBERT, P.; HEAVENS, D.; KANAMORI, H.; KAWAURA, K.; KOBAYASHI, F.; KRASILEVA, K.; KUO, T.; MCKENZIE, N.; MURATA, K.; NABEKA, Y.; PAAPE, T.; PADMARASU, S.; PERCIVAL-ALWYN, L.; KAGALE, S.; SCHOLZ, U.; SESE, J.; JULIANA, P.; SINGH, R.; SHIMIZU-INATSUGI, R.; SWARBRECK, D.; COCKRAM, J.; BUDAK, H.; TAMESHIGE, T.; TANAKA, T.; TSUJI, H.; WRIGHT, J.; WU, J.; STEUERNAGEL, B.; SMALL, I.; CLOUTIER, S.; KEEBLE-GAGNÈRE, G.; MUEHLBAUER, G.; TIBBETS, J.; NASUDA, S.; MELONEK, J.; HUCL, P.J.; SHARPE, A. G.; CLARK, M.; LEGG, E.; BHARTI, A.; LANGRIDGE, P.; HALL, A.; UAUY, C.; MASCHER, M.; KRATTINGER, S. G.; HANDA, H.; SHIMIZU, K. K.; DISTELFELD, A.; CHALMERS, K.; KELLER, B.; MAYER, K. F. X.; POLAND, J.; STEIN, N.; MCCARTNEY, C. A.; SPANNAGL, M.; WICKER, T.; POZNIAK, C. J. Multiple wheat genomes reveal global variation in modern breeding. **Nature**, v. 588, n. 7837, p. 277-283, 2020.

XUE, D.; ZHANG, X.; LU, X.; CHEN, G.; CHEN, Z. -H - Molecular and Evolutionary Mechanisms of Cuticular Wax for Plant Drought Tolerance: review article. **Frontiers in Plant Science**, v. 28, article 621, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.0062>.

ZADOKS, J. C.; CHANG, T. T.; KONZAK, C. F. A decimal code for the growth stages of cereals. **Weed Research**, v. 14, n. 6, p. 415-421, 1974. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x>.

Embrapa

Cerrados

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

CGPE 016910